

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de l'activité de liaison à l'ADN de p53, AP-1 et ATF-2 chez des fibroblastes de derme en sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques répétés sous UVB

El Kadiri, Hannaâ

Award date:
2004

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Etude de l'activité de liaison à l'ADN de p53, AP-1 et ATF-2 chez des fibroblastes de derme
en sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques répétés sous UVB

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Hannaâ EL KADIRI

Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude de l'activité de liaison à l'ADN de p53, AP-1 et ATF-2 chez des fibroblastes de derme en sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques répétés sous UVB

EL KADIRI Hannaâ

Résumé

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié la sénescence répllicative de fibroblastes diploïdes humains de peau de souche AG04431 et la sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques (SIPS) sous UVB sur des cellules de la même souche. Nous avons d'abord montré l'apparition des biomarqueurs de la sénescence dans notre modèle de fibroblastes en SIPS induite sous UVB. Ensuite, nous avons étudié des mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence répllicative et l'apparition de la SIPS. Cette partie a permis de mettre en évidence l'implication de certains facteurs de transcription et protéines dans l'établissement de la SIPS induite sous UVB. Parmi ceux-ci, nous avons montré que les facteurs de transcription p53, ATF-2 et AP-1 de même que les protéines JNK sont activés dans notre modèle. Afin de déterminer, dans notre problématique, le rôle de p53 et celui des JNK participant à l'activation d'ATF-2 et AP-1, nous avons utilisé des inhibiteurs chimiques. Concernant p53, nous avons pu démontrer l'efficacité de son inhibiteur dans notre modèle. Par contre, l'inhibiteur des JNK présente une toxicité trop élevée sur nos cellules, c'est pourquoi nous devons envisager l'emploi d'autres méthodes d'inhibition.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur: O. Toussaint

1 INTRODUCTION

1.1 LA SÉNESCENCE REPLICATIVE ET LA SÉNESCENCE INDUITE PRÉMATUREMENT PAR LES STRESS

1.1.1 Définition de la sénescence rélicative et limite de Hayflick

Les cellules somatiques en culture *in vitro* ne se divisent pas de façon indéfinie. Elles subissent un nombre déterminé de divisions après quoi elles arrêtent de proliférer (**Figure I-1**). Cet arrêt définitif et irréversible de croissance porte le nom de sénescence rélicative, ou limite de Hayflick. En effet, en 1961, L. Hayflick et P. Moorhead ont mis pour la première fois en évidence le fait que les fibroblastes de poumons fœtaux humains cultivés *in vitro* avaient une capacité limitée de réplication. De cette façon, ils ont mis fin au mythe selon lequel les cellules cultivées *in vitro* étaient immortelles (Hayflick *et al.*, 1965).

Cependant, bien qu'elles ne se divisent plus, les cellules en sénescence rélicative restent vivantes et métaboliquement actives. Seulement trois types cellulaires font exception à la règle : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes et les cellules tumorales (Campisi *et al.*, 2000).

L'âge d'une culture de fibroblastes s'exprime en nombre de passage en cultures (CPD: « cumulative population doubling»). La sénescence rélicative est donc un phénomène qui dépend du nombre de divisions que la cellule a déjà subi, et non du temps. En effet, des cellules congelées pendant une certaine période conservent l'empreinte de leur âge biologique, en terme de nombre de divisions et ce, quel que soit le temps chronologique écoulé. A l'heure actuelle, il semble que cette « horloge mitotique » trouve son origine dans le raccourcissement des télomères (Shay *et al.*, 2000).

Les fibroblastes représentent le type cellulaire auquel ce travail est consacré. Le vieillissement *in vitro* des fibroblastes est devenu, depuis les travaux de Hayflick et Moorhead, un modèle classique de l'étude du vieillissement cellulaire (Toussaint *et al.*, 2000). Les fibroblastes en culture sous 20% d'oxygène arrêtent de proliférer au-delà de 50 +/- 10 de passage en cultures (Von Zglinicki *et al.*, 2003).

1.1.2 La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)

Les cellules sont continuellement exposées à une grande variété de stress, ce qui est potentiellement dangereux pour le maintien des fonctions métaboliques et de l'intégrité cellulaire. Parmi ceux-ci, on peut citer l'hypoxie, les chocs osmotiques, les mutations, les chocs thermiques ou les radiations UV (Toussaint *et al.*, 2000). Pour faire face à ces stress permanents et selon les types cellulaires, différents mécanismes de défense ont vu le jour au cours de l'évolution. On retrouve parmi ceux-ci des mécanismes de réparation de l'ADN, les protéines chaperonnes ou de chocs thermiques (HSPs) ou encore des enzymes antioxydantes (Toussaint *et al.*, 1995). L'intensité et la nature du stress déterminent le type de réponse cellulaire.

Les stress peuvent être classés en trois catégories (Toussaint *et al.*, 1991).

- Les stress de faible intensité. Ils stimulent sans cesse les systèmes de défense et de réparation de la cellule sans créer de dommages irréversibles. Parmi ceux-ci, citons les fluctuations faibles de température, de pH et de courants ioniques.

- Les stress d'intensité intermédiaire. Ceux-ci s'accompagnent d'une accumulation de dommages plus rapide que lors d'un stress de faible intensité. Comme ce type de stress n'entraîne pas la mort cellulaire, on parle d'un stress subcytotoxique ou subléthal.
- Les stress cytotoxiques. Ces derniers outrepassent les capacités adaptatives cellulaires, ce qui a pour conséquence l'accumulation de dommages irréversibles et la mort cellulaire par apoptose.

Un état proche de la sénescence peut être induit prématurément par un stress. On parle alors de la sénescence induite prématurément par les stress ou SIPS. Dans ce cas, les cellules acquièrent certaines caractéristiques biochimiques et morphologiques d'une cellule en sénescence répllicative alors qu'elles n'ont pas encore épuisé leur potentiel prolifératif. Un certain nombre de types cellulaires prolifératifs comme les fibroblastes diploïdes humains (FDHs), les mélanocytes ou les cellules endothéliales exposés à des stress subcytotoxiques (UV, H₂O₂, éthanol, etc.) subissent la SIPS (pour une revue : Toussaint *et al.*, 2002). Les cellules en SIPS partagent un certain nombre de caractéristiques morphologiques, biochimiques et moléculaires avec les cellules en sénescence répllicative. Ces caractéristiques sont appelées biomarqueurs et font l'objet du paragraphe suivant.

1.1.3 Biomarqueurs cellulaires et moléculaires observés en sénescence répllicative et en SIPS

1.1.3.1 LES MORPHOTYPES

Au cours du vieillissement cellulaire, les fibroblastes présentent des modifications morphologiques : ils deviennent de plus en plus étalés. Ces modifications morphologiques sont la conséquence de changements au niveau moléculaire. Bien qu'ils ne se divisent plus, ils continuent à synthétiser des protéines. Cette augmentation du contenu protéique participe à l'élargissement de la cellule. De plus, les monomères d'actine polymérisent afin de former des filaments d'actine. Ces derniers peuvent s'assembler et former des fibres de stress. Des protéines d'adhésion se lient aux extrémités de ces fibres de stress et forment des plaques d'adhésion. Ces modifications conduisent à la forme aplatie et étalée des cellules en sénescence répllicative (Chen *et al.*, 2000).

En 1988, Bayreuther proposa une classification des fibroblastes en sept morphotypes sur base de leur taille et de leur forme (Bayreuther *et al.*, 1988). Au cours des passages en culture, il y a transfert des morphotypes mitotiques vers les morphotypes postmitotiques. Les trois premiers morphotypes (MF I, II, III) (**Figure I-2**) sont mitotiques tandis que les quatre derniers (PMF IV, V, VI et VII) sont postmitotiques. Les premiers passages en culture sont caractérisés par une dominance des morphotypes de type mitotique MF I et MF II. Au fil des passages en culture, le morphotype mitotique MF III devient prédominant. Au cours des derniers passages en culture, les cellules se rapprochent de la sénescence et les morphotypes postmitotiques PMF IV, PMF V et PMF VI s'accumulent. On détecte rarement le morphotype post-mitotique VII, dit nécrotique, correspondant à un stade de dégénérescence. Ils dégénèrent rapidement et meurent (Toussaint *et al.*, 1991).

Une telle tendance est observée *in vivo* sur des biopsies venant d'individus d'âges différents ; les morphotypes âgés s'accumulent *in vivo* au cours du vieillissement (Bayreuther *et al.*, 1988).

Suite à leur exposition à des stress subcytotoxiques, les cellules présentent aussi des variations morphologiques *in vitro*. Comme pour les cellules sénescents, cela se manifeste par une proportion des morphotypes postmitotiques plus importante (**Figure I-3**) (Toussaint *et al.*, 2002).

1.1.3.2 L'ACTIVITE β -GALACTOSIDASE ASSOCIEE A LA SENESCENCE (SA β -GAL)

La β -galactosidase est une hydrolase eucaryotique localisée dans les lysosomes. Elle clive le lien terminal β de résidus galactosyles comme celui des glycoprotéines ou de substrats chromogéniques artificiels comme le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactopyranoside (x-gal). En laboratoire, le produit de l'activité enzymatique de la β -galactosidase sur le x-gal donne une coloration bleue aux cellules. Son activité est optimale à pH acide (pH 4,0 - 4,5), qui est proche du pH observé dans les lysosomes (Kurz *et al.*, 2000).

En utilisant du x-gal, il est possible de mettre en évidence l'activité de l'enzyme dans la plupart des cellules de mammifères (jeunes et sénescents) et ce, à pH 4. Il est aussi possible de détecter cette activité à pH 6 chez des fibroblastes sénescents en culture (**Figure I-4**) car ces derniers possèdent un contenu en lysosomes plus important que les fibroblastes jeunes, si bien que l'activité β -galactosidase peut être détectée dans ce cas à un pH suboptimal, c'est-à-dire, à pH 6. On parle alors d'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal). La détection de l'activité de la β -galactosidase à pH 6 représente donc un outil moléculaire pour la détection de cellules en sénescence.

Certains types cellulaires soumis à des stress subcytotoxiques présentent aussi une activité SA β -gal. C'est notamment le cas des FDH entrés SIPS sous UVB (Chainiaux *et al.*, 2002a) et des fibroblastes (WI-38) entrés en SIPS au *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) (Dumont *et al.*, 2000) (**Figure I-5**).

1.1.3.3 REGULATION ET ARRÊT DU CYCLE CELLULAIRE

1.1.3.3.1 GENERALITES

La caractéristique majeure de la sénescence répliquative est un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Des cellules sénescents stimulées avec des facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou le PDGF (Platelet derived Growth Factor) ne passent pas au-delà de la phase G1 du cycle cellulaire, bien que les récepteurs membranaires présentent une affinité de liaison similaire à celle des cellules jeunes (Goldstein *et al.*, 1990).

De plus, diverses expériences de fusion ont démontré ce caractère. Par exemple, la fusion de ces cellules avec des cellules jeunes et prolifératives ou avec des cellules tumorales conduit à un hybride sénescents. De plus, contrairement aux jeunes fibroblastes, les cellules en sénescence répliquative ne répondent pas aux facteurs de croissance et les hybrides entre cellules sénescents et cellules tumorales ou jeunes n'y répondent pas non plus (Campisi *et al.*, 1997).

L'arrêt de la prolifération n'est donc pas lié à un manque de facteurs de croissance, mais à des modifications moléculaires conduisant à l'expression de facteurs dominants induisant le phénotype sénescents.

En effet, l'arrêt du cycle cellulaire est principalement médié par des modifications de la régulation de plusieurs familles protéiques impliquées dans la progression du cycle cellulaire, dont, les kinases dépendantes de cyclines (CdK) et les inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines (CdKI).

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases:

- La phase G1 (Gap 1)
- La phase S (Synthèse d'ADN)
- La phase G2 (Gap 2)
- La phase M (Mitose)

La fin de la phase G1 est caractérisée par un point de restriction. C'est à ce niveau que la cellule "décide" ou non de se diviser.

Les kinases dépendantes de cyclines (CdK) font partie d'une famille de sérine/thréonine kinases essentielles à la régulation des différentes étapes du cycle cellulaire. Ces kinases permettent à la cellule de progresser à travers le cycle cellulaire par phosphorylation de différents substrats. Elles sont dépendantes d'une seconde famille de protéines, les cyclines. Dans le cycle cellulaire, le rôle des cyclines est de lier et d'activer les CdK. Sans la liaison aux cyclines, les CdK ne peuvent exercer leur activité kinasique (Hengstschlager *et al.*, 1999).

Les cyclines D (D1, D2 et D3) sont synthétisées en début de la phase G1 en réponse à un stimulus mitotique. Elles lient préférentiellement les CdK 4 et CdK 6 (Matsushime *et al.*, 1994). La cycline E est synthétisée en phase G1. Elle lie principalement les CdK 2. L'activité de ce complexe est maximale en fin de phase G1 jusqu'à la transition G1/S (Lees *et al.*, 1992). La cycline A est synthétisée en fin de phase G1 et lie les CdK 2 juste avant la transition G1/S. Ce complexe est nécessaire à la réplication de l'ADN (Stein *et al.*, 1991).

D'autre part, la régulation des CdK se fait de façon négative par des protéines inhibitrices des CdK (CdKI). Elles représentent une famille de protéine empêchant la croissance cellulaire.

Les CdKI sont réparties en deux familles: les INK4 (Inhibitor Kinase 4) (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d}) et les KIP (Kinase Inhibitor Protein) (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) (Gerland *et al.*, 2001).

Les membres de la famille des INK4 se lient à tous les complexes contenant les CdK4 et CdK6. L'action inhibitrice se fait soit en empêchant la liaison de la cycline activatrice (Hirai *et al.*, 1995), soit en dissociant la cycline de la CdK (Parry *et al.*, 1995).

Les membres de la famille de p21^{Waf-1} inhibent tous les complexes cyclines-CdK de la phase G1 et peuvent également bloquer la phase G2 (Harper *et al.*, 1993). Le niveau d'ARN de p21^{Waf-1} est 10 à 20 fois plus important chez les fibroblastes sénescents (Wong *et al.*, 1996). p21^{Waf-1} est activée de manière transcriptionnelle par p53 suite à des dommages à l'ADN et inactive le complexe CdK 2-cycline E (Dulic *et al.*, 1994). L'arrêt de croissance chez les cellules sénescents serait donc médié par p21^{Waf-1} et sa régulation négative sur les complexes CdK-cyclines.

p53 est un facteur de transcription important dans la médiation de l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose. En condition normale, son niveau cellulaire est faible, mais son expression est fortement induite par des agents génotoxiques comme les ultraviolets.

Un autre acteur protéique impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire est la protéine du rétinoblastome (pRb). Cette protéine est régulée positivement par sa déphosphorylation et négativement par sa phosphorylation (De Caprio *et al.*, 1989). En phase G0 et au début de la phase G1, pRb est déphosphorylée, tandis qu'en fin de phase G1, en phase S, G2 et M, elle est hyperphosphorylée. Lorsqu'elle est hypophosphorylée, elle est capable de lier le facteur de

transcription E2F ce qui empêche ce dernier d'activer la transcription de ses gènes cibles. Dans son état hyperphosphorylé, pRb ne lie plus E2F.

La phosphorylation de pRb se fait par des complexes cyclines-CdK (CdK 4/6-cycline D en phase G1 précoce et CdK2-cycline A/E en phase G1 tardive) (pour une revue : Rohde *et al.*, 1996) et sa déphosphorylation par des phosphatases, principalement PP1 (Protein Phosphatase 1) (Durfee *et al.*, 1993). Lorsqu'elle est hypophosphorylée, pRb retient la cellule en phase G1 et agit donc comme inhibiteur du cycle cellulaire (**Figure I-6**).

Ces différents acteurs protéiques agissent ensemble ou dans des directions opposées afin de permettre la progression du cycle cellulaire, ou son arrêt. Par exemple, lors de dommages à l'ADN, p53 est activé ce qui entraîne l'expression et l'activation de p21^{Waf-1} (**Figure I-7**). Ce CdKI inhibe alors les complexes cycline-CdK ce qui aura pour conséquence une hypophosphorylation de pRb. Cet état permet à pRb de séquestrer le facteur de transcription E2F, qui n'est plus capable d'activer l'expression des gènes permettant la transition G1/S. Parmi ces gènes de transition, citons la dihydrofolate réductase, la thymidine synthase et l'ADN polymérase- α (Good *et al.*, 1996).

Seront détaillées dans ce qui suit les principales modifications apparaissant au cours de la phase G1 et empêchant l'entrée en phase S des cellules en sénescence répliquative et des cellules en SIPS.

1.1.3.3.2 MECANISMES MOLECULAIRES REGULANT L'ARRÊT DEFINITIF DU CYCLE CELLULAIRE

1.1.3.3.2.1 Répression des gènes de réponse précoce aux mitogènes

Les gènes de réponse précoce aux mitogènes permettent la transition G1-S. Leurs répressions au cours du cycle cellulaire est donc une explication de l'arrêt de croissance des cellules en sénescence répliquative.

Le gène codant pour c-fos, une sous unité du facteur de transcription dimérique AP-1, fait partie de ces gènes. L'expression du gène c-fos est induite par des facteurs de croissance. Cette induction est diminuée chez les fibroblastes sénescents (Cohen *et al.*, 1989). De plus, les facteurs de croissance activent des voies de transduction du signal dont la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) aboutissant à l'activation de ERK. Ce membre de la voie des MAPK induit la transcription du gène c-myc. Chez les jeunes fibroblastes, c-myc active la protéine SRF qui est alors capable de se fixer sur SRE, une séquence du promoteur du gène c-fos. Par contre, chez les fibroblastes âgés, SRF devient hyperphosphorylé, ce qui l'empêche de reconnaître SRE. Via ces deux événements, c-fos voit son expression fortement diminuée en sénescence répliquative (Atadja *et al.*, 1994).

La répression des gènes de réponse précoce aux mitogènes est aussi observée en SIPS. En effet, on observe une diminution du niveau relatif d'expression de c-fos 72h après un stress subcytotoxique à l'H₂O₂ induisant la SIPS (Dumont *et al.*, 2000).

1.1.3.3.2.2 Répression de la phase G1/S

La répression du gène codant pour E2F1, sous-unité du facteur de transcription dimérique E2F a été observée chez les fibroblastes sénescents. Or, ce facteur de transcription est nécessaire à la transcription de gènes impliqués dans la transition G1/S (thymidine synthase, dihydrofolate reductase, etc).

En conditions basales, E2F est inactif car il est lié à la protéine du rétinoblastome (pRb). Mais lorsque pRb est hyperphosphorylé par les complexes cyclines-CdK, E2F n'est plus séquestré et peut exercer son rôle de facteur de transcription. Chez les fibroblastes sénescents, pRb est hypophosphorylé.

En ce qui concerne la SIPS, une étude a montré que des fibroblastes WI-38 soumis à une SIPS sous *t*-BHP étaient caractérisés par une hypophosphorylation de pRb (Dumont *et al.*, 2000).

1.1.3.3.2.3 Répression de cyclines et de kinases dépendantes de cyclines

Les fibroblastes en sénescence répliquative expriment principalement les cyclines de la phase G1 (les cyclines D1 et E), tandis que l'expression des cyclines mitotiques A et B et des CdK 2 est faible (Gerland *et al.*, 2001).

1.1.3.3.2.4 Induction de la synthèse d'inhibiteurs des kinases dépendantes de cyclines

La liaison de CdKI aux complexes CdK-cyclines empêche l'activité kinasique des CdK. Dans les cellules sénescents, l'expression de CdKI tels que p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} ou p16^{INK4a} est augmentée et la progression à travers le cycle cellulaire est bloquée (Gerland *et al.*, 2001).

1.1.3.3.2.5 Arrêt de la prolifération des cellules en SIPS

En ce qui concerne les cellules en SIPS, Dumont *et al.*, ont montré une diminution du pouvoir prolifératif de cellules ayant subi un stress subcytotoxique au *t*-BHP. La mesure de l'incorporation de thymidine tritiée à 96, 120 et 144 heures après le dernier stress montre un profil d'incorporation proche des cellules sénescents (**Figure I-8**) (Dumont *et al.*, 2000).

1.1.3.4 RACCOURCISSEMENT DES TELOMERES

Les télomères constituent l'extrémité des chromosomes. Chez l'homme, ils sont constitués par la répétition d'une séquence répétée non codante « TTAGGG » sur 10 à 15 kb.

Les télomères représentent des constituants génétiques essentiels à la stabilité du matériel génétique : ils empêchent la fusion des chromosomes, ils préviennent de la dégradation des extrémités 5' et 3' par des exonucléases ainsi que les recombinaisons illégitimes (Rhodes *et al.*, 2002).

La longueur des télomères diminue au cours du temps chez les cellules somatiques humaines. Cette perte se chiffre à environ 50 à 150 paires de bases en culture par an *in vitro*, et de 15 à 50 paires de bases par an, *in vivo* (Harley *et al.*, 1990).

L'explication de ce raccourcissement trouve son origine dans le mécanisme de réplication de l'ADN. Pour que l'ADN polymérase puisse commencer à synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin parental, il lui faut une amorce. Celle-ci est fabriquée par l'ADN primase et est constituée d'ARN (environ 10 nucléotides). Lorsque le nouveau brin est synthétisé, l'amorce d'ARN est dégradée sans être remplacée par de l'ADN. Ceci explique pourquoi les chromosomes se raccourcissent un peu plus au fil des divisions. Ajoutons que la réplication

du brin dit « discontinu » se fait par l'ajout de plusieurs amorces d'ARN au sein du brin en cours de synthèse et que ces amorces sont remplacées par de l'ADN (**Figure I-9**).

D'autre part, il existe une enzyme, la télomérase, qui stabilise la longueur des télomères en les rallongeant. De cette manière, elle confère aux cellules des capacités de prolifération illimitée. Indétectable dans les tissus normaux, elle est exprimée dans les cellules germinales et au cours du développement fœtal, mais aussi dans 80 à 90 % des cancers (Bodnar *et al.*, 1998). C'est une ribonucléoprotéine jouant le rôle de transcriptase inverse. Elle est constituée d'une sous unité catalytique et d'une sous-unité d'ARN intrinsèque. Cette enzyme interagit avec l'extrémité d'ADN télomérique simple brin 3' riche en GT. Quand la télomérase est liée aux télomères, elle utilise son amorce d'ARN comme matrice pour polymériser les brins télomériques. Quand la répétition télomérique est synthétisée, la télomérase est transloquée afin de recommencer le processus.

1.1.3.5 VARIATION D'EXPRESSION GENIQUE

Le niveau d'expression de nombreux gènes est modifié dans les cellules en sénescence répliquative. D'une part, une étude a mis en évidence 80 gènes dont le niveau d'expression ou la régulation postraductionnelle étaient modifiées chez les fibroblastes humains en sénescence répliquative. Ces gènes codent, entre autre, pour des inhibiteurs de croissance (protéine du rétinoblastome, des CdKI, etc.), des protéases de la matrice extracellulaire (collagénase, etc.), des protéines et enzymes de synthèse et de réparation de l'ADN (polymérase- α , etc.) ainsi que des antioxydants (catalase, etc.). D'autre part, une étude basée sur des techniques d'hybridation soustractive a mis en évidence 8 gènes dont l'expression était augmentée en sénescence répliquative (Gonos *et al.*, 1998):

- Le gène codant pour l'apolipoprotéine J, une protéine chaperonne libérée dans le milieu extracellulaire.
- Le gène codant pour l' $\alpha 1$ procollagène, un constituant de la matrice extracellulaire.
- Le gène codant pour l'ostéonectine, une protéine de la matrice extracellulaire.
- Le gène codant pour la fibronectine, un constituant de la matrice extracellulaire qui renforce l'ancrage des cellules sénescences.
- Le gène codant pour SM22, une protéine de 22-kDa qui s'associe aux filaments d'actine et induit un changement dans la morphologie cellulaire.
- Le gène codant pour le cytochrome C oxydase, un intermédiaire de la chaîne respiratoire mitochondriale.
- Le gène codant pour la GTP- α , une protéine impliquée dans l'inhibition des voies de signalisation dépendantes du calcium.
- Le gène codant pour FRS-2 (Fibroblast Receptor Substrate-2), protéine impliquée dans la transduction du signal entre le récepteur au FGF (Fibroblast Growth Factor) et la voie des MAPK (Hadari *et al.*, 1998).

Dès lors, les variations d'expression de ces gènes sont fréquemment utilisées comme biomarqueurs de la sénescence.

1.1.3.6 ALTERATION DU GENOME MITOCHONDRIAL

Les mitochondries sont des organelles (1 μ m de diamètre) assurant la production d'énergie cellulaire. Selon les types cellulaires et en fonction des besoins énergétiques, leur nombre varie de 500 à 2000 par cellule. Chaque mitochondrie est composée d'une double membrane

et d'une matrice. Une de leur particularité est de posséder leur propre matériel génétique, disposé de façon circulaire, présent en plusieurs copies. Celui-ci code majoritairement pour les protéines intervenant dans la respiration cellulaire. Des délétions ou des mutations de cet ADN sont observées en sénescence répliquative chez les fibroblastes. Parmi celles-ci, une délétion, dite « commune », de 4977pb apparaît de façon récurrente chez les cellules en sénescence répliquative (Connie *et al.*, 1997). Cette délétion de 4977pb est également présente dans les cellules ayant subi des stress de type oxydatif au *t*-BHP ayant pour but d'induire la SIPS (**Figure I-10**) (Dumont *et al.*, 2000).

Cette délétion n'est pas dangereuse en soi puisque les cellules possèdent plusieurs mitochondries, mais la fréquence de cette délétion peut être fatale car la cellule peut voir son taux d'ATP chuter et par conséquent, ne plus pouvoir assurer les réactions métaboliques indispensables à son maintien et à sa survie.

1.1.4 Le Transforming Growth Factor β -1 et SIPS

La super-famille du TGF comporte trois sous-familles principales : la sous-famille des TGF- β , la sous-famille des activines et inhibines et la sous-famille des BMP's (« Bone Morphogenetic protein ») (Li *et al.*, 2003).

Actuellement, trois isoformes de la sous-famille du TGF- β sont connues chez les mammifères : le TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Ce sont des polypeptides exprimés de manière ubiquitaire (Clark *et al.*, 1998) qui induisent différentes réponses cellulaires. Parmi celles-ci, citons l'inhibition ou la stimulation de la prolifération, la synthèse ou la dégradation de la matrice extracellulaire. Ils interviennent aussi dans la médiation de la réponse cellulaire à une blessure tissulaire et dans la modulation des fonctions immunitaires.

Les membres de la sous-famille du TGF- β sont sécrétés sous une forme latente (LTGF- β). Ils passent par une étape de maturation afin de pouvoir se lier à leur récepteur et activer la transduction du signal en aval.

Le LTGF- β est composé de 390-414 acides aminés (pour une revue : Verrecchia *et al.*, 2002). Il possède une extrémité N-terminal hydrophobe qui constitue un domaine latent associé au peptide (LPA) et un domaine C-terminal potentiellement activable. Le LTGF- β est sécrété sous la forme d'un complexe lié de façon covalente, via le LPA, à la LTGF- β binding protein (LTBP). Le LPA confère l'état latent au polypeptide tandis que la LTBP permet au TGF- β d'être lié à la matrice extracellulaire afin d'assurer son activation par protéolyse. En effet, l'activation du TGF- β se fait suite à un processus impliquant des changements conformationnels du LTGF- β . Ces changements sont la conséquence d'activités protéolytiques de la plasmine ou de la thrombine qui permettent la libération de la forme active du TGF- β .

Lorsqu'ils sont actifs, les membres de la sous-famille du TGF- β se lient à des récepteurs en surface cellulaire afin de déclencher une voie de transduction du signal. Ceci se fait par la liaison du ligand à un récepteur de type II. Cette liaison stimule la formation d'un hétérodimère entre le récepteur de type II et celui de type I ainsi que l'activité sérine/thréonine kinase du récepteur de type II. Suite à la phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II, une voie de transduction du signal est mise en place par les protéines de la famille des Smads (pour une revue : Moustakas *et al.*, 2001). Il faut souligner que d'autres voies impliquant les MAP Kinases et les SAP Kinases peuvent intervenir dans la transduction du signal induite par le TGF- β .

Les protéines Smads furent pour la première fois identifiées comme les produits des gènes MAD chez la drosophile et SMA chez *C. elegans*. Les protéines Smads sont classées en trois groupes dont les fonctions sont distinctes. Premièrement, on trouve les R-Smads (Receptor-activated Smads) dont Smad 1, 2, 3, 5 et 8. Ces R-Smads cytoplasmiques sont phosphorylées par le récepteur de type I ce qui les active. Deuxièmement, il y a les Co-Smads, dont Smad 4. Celui-ci oligomériser avec un membre des R-Smads lorsque ce dernier est activé par le récepteur de type I. Troisièmement, il y a les I-Smads, dont Smads 6 et 7. Ce sont des inhibiteurs des Smads. Les Smads sont caractérisées par deux domaines principaux : MH1 (N-terminal MAD homology 1) et MH2 (C-terminal MAD homology 2). Le domaine MH1 est impliqué dans la translocation nucléaire (il possède une NLS « Nuclear Localisation Sequence ») et permet la liaison à l'ADN. Le domaine MH2 régule le processus d'oligomérisation et la reconnaissance du récepteur de type I.

La liaison du TGF- β 1 au récepteur de type II conduit à la phosphorylation d'une R-Smad (2 ou 3) sur son extrémité C-terminale par le récepteur de type I. Cette phosphorylation entraîne la formation d'un hétérodimère avec la Co-Smad ou Smad 4. Le complexe ainsi formé est transloqué dans le noyau où il se lie à sa séquence consensus via le domaine MH1. Grâce au domaine MH2, il peut lier des facteurs de transcription ou des co-activateurs tels que la CBP (Creb Binding Protein). Il s'en suit une activation de l'expression des gènes de réponse au TGF- β comme le PAI (Plasminogen Activator Inhibitor) ou le collagène de type VII.

D'autre part, l'implication du TGF- β 1 fut mise en évidence dans une étude de sénescence induite prématurément par un stress subcytotoxique à l'H₂O₂ sur des fibroblastes de poumons foetaux de la souche IMR-90 (Frippiat *et al.*, 2002).

En réponse à la liaison du TGF- β 1 au récepteur de type II, la protéine p38^{MAPK} est activée. Celle-ci est alors transloquée dans le noyau où elle active le facteur de transcription ATF-2. ATF-2 se lie à pRb et active l'expression du TGF- β 1 qui est secrété dans le milieu extracellulaire. Ce dernier se lie à son récepteur de type II ce qui permet le rapprochement du récepteur de type I et son activation. Ceci permet l'activation de p38^{MAPK}. Une boucle de rétroaction est ainsi mise en route avec apparition des biomarqueurs de la sénescence dont la morphologie associée à la sénescence, l'activité SA β -galactosidase et la surexpression de quatre gènes associés à la sénescence (SM22, l'apolipoprotéine J, l'ostéonectine et la fibronectine).

D'autre part, une étude a montré que la SIPS induite par les UV sur des fibroblastes de peau entraînait une surexpression de l'ARN messager du TGF- β 1 (Chainiaux *et al.*, 2002b).

1.2 ULTRAVIOLETS ET REPONSES CELLULAIRES

1.2.1 Structure de la peau

La peau est un organe composé de l'épiderme, tissu majoritairement épithélial, du derme, tissu de nature conjonctive et de l'hypoderme (pour une revue : Stevens *et al.*, 1997) (**Figure I-11**).

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Il est constitué principalement de kératinocytes (>90 %) et repose sur une membrane basale qui le sépare du derme. Les kératinocytes se différencient et migrent de la couche basale vers la surface où ils desquament. D'autres types cellulaires sont présents dans l'épiderme : des mélanocytes, dans la couche basale, produisant la mélanine qui protège les kératinocytes des ultraviolets, et des

cellules de Langerhans intervenant dans la réponse immune et les cellules de Merckel qui agissent comme mécanorécepteurs.

Le derme est situé sous la membrane basale de l'épiderme. C'est un tissu conjonctif constitué principalement de matrice extracellulaire et de fibroblastes. Les fibroblastes sont des cellules fusiformes ou étoilées. Ils proviennent d'une cellule souche mésenchymateuse multipotente qui est également à l'origine des adipoblastes, des chondroblastes, des ostéoblastes et des myoblastes. En microscopie optique, leur cytoplasme est peu visible et seul leur noyau, ovoïde, allongé, avec un ou deux nucléoles, est bien visible. En microscopie électronique, on y décèle tous les organites cellulaires habituels. Les fibroblastes sécrètent du collagène, de l'élastine, de la fibrilline, de la substance fondamentale, des facteurs de croissance et des enzymes dont des collagénases pour dégrader la matrice, la renouveler et la réorganiser. La substance fondamentale contient entre autre des protéoglycanes et de la fibronectine qui permettent les interactions cellule-matrice, les mouvements cellulaires et le contrôle de l'environnement cellulaire au niveau de l'hydratation et de l'équilibre ionique. Le derme apporte à la peau sa résistance et son élasticité.

L'hypoderme est la couche la plus interne peau. Il est constitué de collagène et d'élastine. L'hypoderme sépare le derme des tissus sous-jacents.

1.2.2 Le vieillissement de la peau

Le vieillissement de la peau est un phénomène induit par des facteurs divers. Premièrement, il peut être entraîné par des facteurs génétiques, des changements hormonaux ou encore des réactions métaboliques à l'origine de stress oxydatifs (pour une revue : Scharffetter-Kochanek *et al.*, 2000). Dans ce premier cas, il s'agit de vieillissement intrinsèque. Les mécanismes moléculaires sous-jacents au vieillissement intrinsèque de la peau sont comparables aux mécanismes responsables du vieillissement des organes internes.

D'autre part, la peau est continuellement exposée à une variété de facteurs environnementaux, comme les ultraviolets (UV). Le vieillissement induit par des facteurs environnementaux est désigné comme vieillissement extrinsèque. Précisons que dans le cas du vieillissement accéléré par les UV on parle de photo-vieillissement.

1.2.3 Les ultraviolets

Les radiations ultraviolettes sont divisées en trois classes sur base de leur longueur d'onde: les UVA (320-400 nm) qui représentent 95% du rayonnement ultraviolet, les UVB (320-290 nm) qui représentent 5% et les UVC (<290 nm) qui n'atteignent normalement pas la surface du sol car ils sont arrêtés par la couche d'ozone.

Les ultraviolets sont arrêtés par le derme ou l'épiderme en fonction de leur longueur d'onde (**Figure I-11**):

- Les UVA atteignent le derme où ils génèrent un stress oxydatif par excitation de molécules biologiques photosensibles (Scharffetter-Kochanek, *et al.*, 2000).
- Les UVB traversent l'épiderme et atteignent le derme supérieur. Ils y provoquent un stress oxydatif ainsi que des dommages à l'ADN.
- Les UVC seraient arrêtés par l'épiderme et provoqueraient des dommages à l'ADN.

1.2.4 Les ultraviolets et les dommages cellulaires

La nature des dommages causés par les radiations ultraviolettes dépend de la longueur d'onde de ces rayons. Comme la peau est toujours en contact avec l'oxygène et qu'elle est continuellement exposée aux radiations ultraviolettes, elle représente la cible principale des stress environnementaux photooxydatifs (Yoshiki *et al.*, 1995). Les UV agissent sur différents constituants cellulaires comme les protéines, les acides nucléiques et les flavines (Fuchs *et al.*, 1991).

1.2.4.1 LES REACTIONS PHOTOSENSIBLES DE TYPE I ET DE TYPE II

Les UV sont responsables de réactions photosensibles qui peuvent entraîner des dommages à l'ADN. Ces réactions sont classées en réactions de type I et en réactions de type II (**Figures I-12**):

Dans les réactions de type I, les photons sont absorbés par des molécules photosensibles telles que le NADH/NADPH, le tryptophane, la riboflavine ou l'acide trans-urocanique (Hanson *et al.*, 1998). Cette absorption d'énergie est responsable de l'excitation des électrons périphériques de la molécule biologique. Si le photon est suffisamment énergétique, un électron périphérique est arraché ce qui engendre la formation d'un radical libre. Cette molécule très énergétique peut alors interagir avec l'ADN ou des protéines (Tyrrell *et al.*, 1995).

Dans les réactions de type II, la molécule photosensible électroniquement excitée par les UV entre en interaction avec une molécule d'oxygène. L'oxygène, qui possède deux électrons périphériques aura tendance à apporter un de ses deux électrons à la molécule excitée pour remplacer l'électron arraché. L'oxygène est alors converti en un dérivé actif de l'oxygène (anion superoxyde : $O_2^{\bullet(-)}$). Cette molécule très réactive peut alors provoquer l'apparition d'autres radicaux libres. Ces derniers pourront à leur tour endommager l'ADN ou des protéines.

1.2.4.2 LES DOMMAGES DIRECTS A L'ADN

(pour une revue : Ichihashi *et al.*, 2003)

L'ADN absorbe directement les photons de type UVB et UVC étant donné que son spectre d'absorption est à 260-280nm. En conséquence, l'ADN représente la principale biomolécule sensible aux UV. Cette absorption a pour conséquence la formation de deux types de photo-produits (**Figure I-13**) :

- Le dimère pyrimidine (6-4) pyrimidone (lien covalent entre deux pyrimidines adjacentes (préférentiellement TT et TC)).
- Le dimère pyrimidine-cyclobutane (lien covalent entre deux thymidines adjacentes).

Ces modifications structurales de l'ADN provoquent une torsion anormale dans la double hélice et empêchent l'appariement correct des deux brins au moment de la réplication. Ces phénomènes arrêtent ou freinent considérablement la réplication (pour une revue: Naegeli *et al.*, 1997).

De plus, l'absorption de photons peut directement conduire à des mutations de type:

- GC → TA,
- TA → GC,
- TT → CC

1.2.5 Les voies de transduction du signal induites par les UV

1.2.5.1 ACTIVATION DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES

Les radiations ultraviolettes sont responsables de l'activation de voies de signalisation dans la peau humaine (pour une revue Rittié *et al.*, 2002).

Une des réponses précoces à l'exposition aux UV est l'activation de différents types de récepteurs membranaires aux cytokines et aux facteurs de croissance. Parmi ces récepteurs, citons le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), le récepteur au PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le récepteur au TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et le récepteur à l'IL-1 (Interleukine-1).

Rosette *et al.* (1996) ont montré que l'activation de ces différents récepteurs par les UV entraînait un regroupement et une internalisation de ces derniers.

Le récepteur le mieux caractérisé dans la réponse aux UV est le récepteur à l'EGF. L'activation de ce récepteur est indépendante du domaine de liaison du ligand. En effet, une délétion de ce domaine n'empêche pas l'activation de ce récepteur par les UV. Il semble que l'activation se fasse plutôt au niveau du domaine intracellulaire. En effet, 10 minutes après l'exposition aux UV, on observe la phosphorylation d'un résidu tyrosine du domaine intracellulaire résultant d'une transphosphorylation.

La phosphorylation du domaine intracellulaire du récepteur permet le recrutement de protéines adaptatrices. Ces dernières permettront la médiation du signal en aval induite par les UV (**Figure I-14**) (Rittié *et al.*, 2002).

1.2.5.2 ACTIVATION DE LA VOIE DES MAP KINASES

La cascade des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) peut être activée par les UV. Il existe trois familles principales de MAPK : la cascade des ERK, la voie des SAPK (Stress Activated Protein Kinase), dont fait partie p38^{MAPK}, et les JNK (c-jun NH2-terminal kinase) (pour une revue: Pearson *et al.*, 2001). Schématiquement, les cascades sont composées de trois kinases successives : les MAPKs qui sont des sérines/thréonines kinases, les MAPKKs (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase) et les MAPKKKs (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase). Les voies des MAPKs peuvent être activées par des agonistes se liant à des récepteurs à activité tyrosine kinase ou à des récepteurs couplés à des protéines G, par des facteurs de croissance ou par un stress. L'activation de la cascade des MAPKs peut avoir des conséquences diverses telles que la différenciation, la prolifération, la réponse à un stress ou l'apoptose.

L'activation du récepteur à l'EGF par les UV permet le recrutement de protéines adaptatrices comme Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) (pour une revue Rittié *et al.*, 2002). Ces protéines serviront d'intermédiaire entre le récepteur et la voie de signalisation en aval. Elles vont permettre l'activation de petites protéines G, telles que Ras, Rac et cdc 42 (**Figure I-14**). Ces protéines représentent une famille de régulateurs positifs des cascades Erks, JNKs et p38^{MAPK}.

- Ras recrute Raf-1 (MAPKKK), ce qui permet l'activation de la voie des Erk MAPK.
- Rac-1 et cdc42 active MEKK1 (MAPKKK), ce qui permet à la cascade des Erks, JNKs et p38^{MAPK} d'être activées. Il faut remarquer que Rac-1 active aussi la NADPH oxydase. Cette enzyme est responsable de la formation de l'anion superoxyde, ce qui engendre des dérivés actifs de l'oxygène.

De plus, la voie des MAPK peut être activée par des dérivés actifs de l'oxygène. En effet, les photons activent des molécules photosensibles pouvant entrer en interaction avec une molécule d'O₂. La molécule photosensible retourne à son état fondamental, mais l'oxygène est converti en anion superoxyde. Ce dernier est le substrat de la superoxyde dismutase qui le convertit en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'H₂O₂ est converti en radical hydroxyl par la réaction de Fenton (**Figure I-15**), en présence d'un ion métallique de transition. Ce dernier est capable d'activer des protéines comme Raf-1 et MEKK1 (**Figure I-14**).

1.2.5.3 PROTEINES ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUES DANS LA REPONSE CELLULAIRE AUX ULTRAVIOLETS

1.2.5.3.1 LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION AP-1

AP-1 (Activated Protein-1) est un facteur de transcription dimérique activant l'expression de gènes en réponse à une variété de stimuli extracellulaires incluant les cytokines, les facteurs de croissance et les radiations UV. Les membres de la famille des protéines Jun, Fos ou Fra s'assemblent pour former une unité dimérique qui constitue AP-1. En fonction des conditions cellulaires, deux partenaires dimérisent et activent l'expression de gènes sous contrôle du dimère formé (Angel *et al.*, 2001).

Les cellules de la peau humaine expriment de manière constitutive un taux élevé de la protéine c-fos. En absence d'une exposition aux UV, le dimère AP-1 est principalement formé par l'association de c-fos et jun-D (pour une revue: Rittié *et al.*, 2002). Par contre, l'exposition aux ultraviolets entraîne des modifications d'expression d'AP-1. Premièrement, c-jun voit sa stabilité augmentée par phosphorylation. Les protéines p38^{MAPK} et les JNK sont responsables de cette phosphorylation. De plus, la voie des MAPK active les facteurs de transcriptions aux promoteurs des gènes c-Jun et c-Fos (Elk-1, c-jun et ATF-2). Le niveau cellulaire de c-jun augmente. Il entre en compétition avec jun-D pour c-fos. Finalement, c-jun et c-fos dimérisent pour former une forme active d'AP-1 qui est exprimée dans toutes les couches du derme et de l'épiderme.

AP-1 régule l'expression de différents types de gènes comme ceux impliqués dans la différenciation ou la régulation de la croissance sous l'induction de facteurs de croissance. Cependant, en réponse aux UV, AP-1, va d'une part, activer l'expression de gènes codant pour des métalloprotéinases (**Figure I-14**) de la matrice extracellulaire (MMPs). Ces MMPs représentent une famille d'enzymes qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire. Selon leur spécificité et leur substrat préférentiel, les MMPs peuvent être classées en au moins quatre groupes distincts: collagénases, gélatinases, stromélysines et métallo-élastases (Fisher *et al.*, 1998). D'autre part, AP-1 va aussi inhiber l'expression des deux gènes codant pour le procollagène de type I.

Toutes ces modifications d'expression génique ont pour conséquence l'apparition des modifications morphologiques accompagnant le photovieillissement.

Cliniquement, le photovieillissement se manifeste par un amincissement de l'épiderme, une diminution du collagène et des fibres élastiques ce qui entraîne une perte d'élasticité de la peau et la formation des rides profondes (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 2000, Jenkins, 2002).

1.2.5.3.2 LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION ATF-2

La famille des facteurs de transcription ATF/CREB forme un groupe de protéines caractérisé par la présence d'un domaine « tirette à leucine » basique. Elles reconnaissent la séquence consensus ATF/CRE 5'TGACGTCA'3 dans les promoteurs de leurs gènes cibles.

ATF-2 (Activating Transcription Factor-2), ou CRE-BP1, est une protéine de 487 acides aminés, dont le gène est localisé sur le chromosome 2. Elle est impliquée dans la réponse aux stress cellulaires tels que des dommages à l'ADN (Hayakawa *et al.*, 2003). Ce facteur de transcription est localisé dans le noyau sous sa forme non phosphorylée, ce qui lui donne un statut inactif en ce qui concerne son activité de transactivation. Cette protéine est caractérisée par la présence d'un groupe d'acides aminés basiques qui constitue son domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine de type « tirette à leucine » lui permettant d'homodimériser ou de dimériser avec c-Jun (Sano *et al.*, 1998).

ATF-2 est responsable de l'activation de la transcription de toute une série de gènes comme le TGF- β 1, le TGF- β 2, la fibronectine et Rb (Kim *et al.*, 1992). En plus de ces gènes, ATF-2 régule l'expression de la topoisomérase I et de l'ADN polymérase β . L'ADN forme des superhélices que la polymérase peut déplier. ATF-2 peut donc activer des systèmes de réparation de l'ADN (Baumgartner *et al.*, 1994).

ATF-2 est impliqué dans la réponse aux UV (**Figure I-14**). Son activation passe par l'activation de récepteurs membranaires et la voie des MAPK. L'activité biologique d'ATF-2 est contrôlée par la phosphorylation de deux thréonines situées dans la région N-terminale du domaine d'activation (Steinmuller *et al.*, 2003). Cette phosphorylation est, entre autre, la conséquence de l'activité des kinases p38^{MAPK} et JNK.

1.2.5.3.3 LA FAMILLE DES PROTEINES p38^{MAPK}

L'activation des protéines de la famille p38^{MAPK} a été observée dans divers processus, comme la croissance cellulaire, la différenciation, la réponse aux stress extracellulaires (UV), le cycle cellulaire ou encore dans des contextes inflammatoires (pour une revue : New, 1998). De plus, ces protéines sont aussi impliquées dans la mobilité cellulaire, le remodelage de la chromatine et dans les réponses à des variations de volumes cellulaires dus à des stress hyper ou hypoosmotiques .

Il existe donc divers stimuli, qui, en fonction du type cellulaire, sont capables d'activer p38^{MAPK}. Parmi ceux-ci, citons : les stress environnementaux tels que les ultraviolets et chocs thermiques, les facteurs de croissance tel que le PDGF, les molécules pro-inflammatoires comme le PAF et l'hypoxie.

Le fait que les membres de la famille p38 soient impliqués dans des processus aussi diversifiés peut s'expliquer par la diversité des protéines les régulant positivement. Parmi celles-ci, citons, MEKK4, TAK1 (TGF- β 1 Activated Kinase 1) et MLK2/MST (Mixed Lineage Kinase/ Mammalian STE20-like) (Ono *et al.*, 2000).

p38 compte aujourd'hui cinq isoformes (p38 α , β , γ , δ et p38-2) que l'on classe sur base de la spécificité de leurs substrats. Les isoformes α et β sont exprimées de façon ubiquitaire, tandis

que les isoformes γ et δ sont spécifiques à certains tissus : p38 γ est principalement exprimé dans les muscles squelettiques et p38 δ dans les poumons, les reins et le pancréas (Ono *et al.*, 2000).

L'activation des protéines p38 se fait via une double phosphorylation par la MAPKK en amont. Cette double phosphorylation a lieu sur le motif TXY (thréonine-X-Tyrosine). Une fois activées, les p38 activent leurs substrats par phosphorylation.

Le premier substrat de p38 α mis en évidence est la MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAP-K2 ou M2). M2 activée phosphoryle différents substrats tels que HSP27 (heat shock protein 27) et LSP1 (lymphocyte-specific protein one).

À l'heure actuelle, d'autres substrats des p38 α et β ont été mis en évidence.

La PRAK (p38 regulated/activated kinase) une protéine de réponse à des stress et MSK (mitogen and stress activated kinase) activée lors de stress ou en présence de facteurs mitogéniques .

De plus, certains facteurs de transcription font partie des substrats de p38, dont, ATF-2/1, p53 ou encore MEF2A (myocyte enhance factor 2A). L'activation de ces facteurs de transcription conduit à l'expression de gènes. Parmi ceux-ci, les gènes codant pour c-jun et c-fos, pour des cytokines (IL-1, IL-8, TNF), pour des protéines d'adhérence (VCAM-1), etc. (Ono *et al.*, 2000).

p38^{MAPK} est activée lors d'une exposition aux UV. La voie de signalisation aboutissant à l'activation de p38^{MAPK} par les UV et l'expression de gènes en résultant est reprise à la **figure I-14**.

1.2.5.3.4 LE GENE SUPPRESSEUR DE TUMEUR P 53

Les mutations du gène suppresseur de tumeurs sont les altérations génétiques les plus communes dans les cancers humains. Ce gène est localisé sur le bras court du chromosome 17, s'étend sur 20 kb et est composé de 11 exons. Le produit de son expression est une phosphoprotéine nucléaire de 53 kDa, communément désignée sous le nom de p53.

La protéine humaine p53 (393 acides aminés) est un facteur de transcription intervenant dans la régulation de processus tels que le cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Les mécanismes moléculaires qui activent p53 impliquent des modifications post-traductionnelles de types phosphorylation et acétylation (pour une revue : Leblanc *et al.*, 2002).

La protéine p53 joue un rôle central dans les réponses cellulaires vis à vis des stress génotoxiques. Dans les cellules où il n'y a pas de perturbations de l'intégrité du matériel génétique, elle est inactive et est maintenue à un faible niveau par son association avec l'oncoprotéine mdm2. Par contre, des stress génotoxiques tels que les radiations UV ou les radiations ionisantes déclenchent des voies de signalisation qui aboutissent à la stabilisation de p53, son accumulation dans le noyau et son activation comme facteur de transcription. Activée, p53 reconnaît une séquence d'ADN contenant deux copies d'un motif de 10 paires de bases (ER, pour élément de réponse à p53). Elle active l'expression des gènes contenant cette séquence dans leur promoteur comme les gènes p21^{WAF-1}, Fas et Bax (**Figure 1-16**) mais elle est aussi capable de réprimer la transcription d'autres gènes en interagissant avec des éléments de la machinerie transcriptionnelle comme la TBP (TATA box binding protein) ou

des régulateurs activateurs ou répresseurs de la transcription. Parmi ces gènes réprimés, citons les gènes codant pour Bcl-2 ou l'interleukine-6.

La protéine p53 est organisée en trois domaines structuraux distincts (**Figure 1-17**) (May *et al.*, 1999):

- Une partie N-terminale. Ce domaine renferme le domaine d'activation de la transcription et le site de liaison à la protéine mdm2.
- Une partie centrale constituant un domaine structural capable de se lier à l'ADN.
- Une partie C-terminale chargée positivement et qui contient les domaines de localisation nucléaire et le domaine d'oligomérisation de la protéine. En effet, p53 s'associe à d'autres protéines afin de former un tétramère.

L'activation de p53 lors de dommages à l'ADN causé par les UV implique des modifications post-traductionnelles conduisant à l'accumulation nucléaire d'une protéine active transcriptionnellement (May *et al.*, 1999). Ces modifications induisent la fixation de p53 à un ER et l'expression de ces gènes (p21^{WAF-1}, BAX, etc.). La régulation de l'activité transcriptionnelle de p53 dépend de son état de phosphorylation. Les sites de phosphorylation sont regroupés aux extrémités N-terminale et C-terminale.

La phosphorylation de p53, conséquence de perturbations de l'intégrité du génome, se fait par des protéines kinases répondant à un stress cellulaire telles que les membres de la famille des kinases phosphatidylinositol 3' (ATM kinase, ATR kinase, etc) et certains membres de la famille des SAPK dont p38^{MAPK} et JNK-1.

Des études ont montré que l'exposition de cellules aux UV entraîne la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 par p38^{MAPK} et ou par la voie des ERKs. En conséquence, elle n'est plus exportée vers le cytoplasme (She *et al.*, 2000).

La réponse cellulaire entraînée par l'activation de p53 est dépendante de la dose d'UV reçue. D'une part, à faible dose (<200J/m²), l'activation de p53 entraîne l'expression de p21^{WAF-1} et donc un arrêt du cycle cellulaire. A des doses plus élevées, p53 active l'expression de BAX, un médiateur de l'apoptose (Li *et al.*, 1998). En effet, si les dommages ne sont pas considérables, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par activation de p21^{WAF-1} permettra à des complexes enzymatiques de réparation de l'ADN d'exercer leur activité. Parmi ces systèmes de réparation, citons le système de réparation par excision de nucléotide (NER) ou par excision de base (EBR) (Ichihashi, *et al.*, 2003). Par contre, si les dommages sont trop importants et qu'il y a un risque de propagation de cellules présentant un potentiel oncogénique le processus de mort par apoptose est alors déclenché (Pellegata, 1996).

Finalement, les UV entraînent l'activation de p53 qui en fonction de la dose reçue, ou en d'autres termes, des dommages causés au génome, activera les acteurs favorisant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose.

OBJECTIFS DU MEMOIRE

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au phénomène de sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques (SIPS) répétés aux ultraviolets de type B sur des fibroblastes humains de derme de la souche AG04431.

L'activation de différents facteurs de transcription et l'expression de protéines de réponse aux stress seront comparées entre les fibroblastes entrés en SIPS par des stress sous UVB et les fibroblastes arrivés au terme de leur potentiel prolifératif.

Pour cela, les fibroblastes de la souche AG04431 cultivés *in vitro* seront soit maintenus en culture jusqu'à atteindre leur limite proliférative, soit soumis à des stress répétés aux UVB à doses subcytotoxiques, selon le modèle élaboré préalablement au laboratoire.

Afin de s'assurer que les cellules sont bien en sénescence répllicative et que la SIPS a bien été induite, deux biomarqueurs de la sénescence seront analysés: l'activité β -galactosidase associée à la sénescence et la diminution du potentiel prolifératif.

Nous nous intéresserons ensuite à certains facteurs de transcription connus pour être impliqués dans la réponse aux stress et l'arrêt du cycle cellulaire. Nous nous focaliserons sur p53, AP-1 et ATF-2. Si ceux-ci montrent une augmentation de leur liaison à l'ADN, nous tenterons de mettre au point un modèle les inhibant en vue de connaître leur rôle dans la SIPS induite sous UVB.

Enfin, nous chercherons à caractériser plus en détail la SIPS induite par les UVB. Dans ce but, nous essayerons de mettre en évidence par western blot les modifications d'expression ou d'activation par phosphorylation de diverses protéines impliquées dans la réponse aux stress, telles que p38^{MAPK} et les JNK.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 CULTURE DE FIBROBLASTES FS

Les cellules FS sont des fibroblastes de derme fœtaux d'origine humaine (AG04431). Ces cellules proviennent du « Corriel Cell Institute ».

2.1.1 Repiquage des fibroblastes FS

Les cellules sont maintenues en culture selon la méthode classique décrite par Hayflick (**Figure II-1**). Elles sont cultivées en routine dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75). Une fois arrivées à confluence (densité moyenne 20 000 cellules par cm²), les cellules sont repiquées en conditions stériles.

2.1.1.1 MATERIEL

- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)
- BME (Basal Medium Eagle, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- FBS (Sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Antibiotiques (Pénicilline (50 U/ml)-Streptomycine (50 µg/ml) (Bio-Whittaker, Verviers, Belgique))
- L-Glutamine (2mM) (Sigma, St-Louis, U.S.A.)
- Trypsine : Trypsine à 0,25 % dans un tampon Tris (0,4 g/l KCl ; 2,2 g/l Na HCO₃ ; 6,8 g/l NaCl ; 1,0 g/l glucose ; 0,5 mg/l rouge phénol) (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Boîtes de culture stériles (75 cm²= T75) (Costar, U.S.A.)

2.1.1.2 REPIQUAGE

Le milieu est décanté et les cellules sont rincées deux fois au PBS, ce qui permet d'éliminer les inhibiteurs de trypsine présents dans le milieu.

Un ml de trypsine est ajouté, ensuite, la boîte est incubée 5 à 10 minutes à 37°C, température optimale de l'activité enzymatique de la trypsine.

Lorsque les cellules sont détachées, 10 ml de milieu BME + 10 % FBS sont ajoutés à la T75 les agrégats cellulaires sont homogénéisés avec une pipette pasteur.

L'ensemble de la solution (cellules-milieu) est divisé en 2 ou 4 nouvelles T75 auxquelles du BME + 10 % FBS sera ajouté pour arriver à un volume final de 15 ml par T75.

Les boîtes sont placées dans une étuve à 37°C diffusant de l'air chargé de 5 % de CO₂ en laissant le bouchon légèrement ouvert afin d'ajuster le pH du milieu de culture.

2.1.1.3 COMPTAGE DES CELLULES

Le comptage se fait dans une chambre de Neubauer. Une goutte de la suspension cellulaire est déposée de part et d'autre de la chambre de Neubauer (**Figure II-2**). Le comptage se fait dans les quatre carrés supérieurs et inférieurs de la chambre. Une moyenne des huit valeurs est

réalisée. La moyenne est multipliée par 10 000, facteur de correction correspondant au rapport entre le volume d'un des huit carrés et la quantité de solution déposée, ce qui permet d'estimer le nombre de cellules par ml de la solution.

2.1.2 Congélation et décongélation des fibroblastes FS

2.1.2.1 CONGELATION

Par tube de congélation, il faut :

- 0,4 ml de milieu BME + 40 % FBS (Sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- 0,4 ml de milieu BME + 20 % DMSO (Diméthylsulfoxyde : agent cryoprotecteur utilisé lors de la congélation des cellules (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Le milieu est décanté, puis les boîtes sont rincées 2 fois avec du PBS. Un ml de trypsine est ajouté puis les cellules sont placées à 37°C. Après 10 minutes d'incubation, elles sont resuspendues dans 10 ml de milieu BME + 10 % FBS. Ensuite, une centrifugation est réalisée pendant 10 minutes à 1000 rpm et à température ambiante (Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne).

Le surnageant est décanté et le culot de cellules est récupéré et resuspendu dans 0,4 ml de BME + 40 % FBS. Ce mélange est ensuite transvasé dans une ampoule (Corning, Cambridge, U.S.A.) et homogénéisé avec 0,4 ml de BME + 20 % DMSO.

L'ampoule est ensuite placée à -70°C dans un système de congélation progressive, avant d'être conservée à -196°C dans de l'azote liquide.

2.1.2.2 DECONGELATION DES FIBROBLASTES

L'ampoule de congélation est immédiatement plongée dans un bain à 37 °C 1 à 2 minutes, afin de décongeler rapidement les cellules.

Ensuite, les cellules sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans du BME + 10 % FBS et transféré dans une nouvelle boîte de culture.

Le lendemain, le milieu de culture des cellules est renouvelé afin d'éliminer toute trace de DMSO qui est toxique pour les cellules.

2.2 STRESS SUBCYTOTOXIQUES AUX U.V.B

2.2.1 Modèle de base

2.2.1.1 MATERIEL

- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)
- BME + 1 % FBS (Milieu BME additionné de 1% de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Lampe U.V.B (TL 20 W/01) (Philips, The Netherlands), longueur d'onde 312 nm.

-
- Radiomètre et capteur U.V.B (Bioblock Scientific, Belgique)

2.2.1.2 METHODE

72 heures avant le premier stress, les cellules FS sont repiquées à une confluence de 10 000 cellules/cm² dans du BME + 1% de FBS.

Avant de réaliser les stress, le milieu est décanté, les cellules sont rincées une fois au PBS, puis sont recouvertes d'une fine couche de PBS pour l'exposition aux U.V.B. Les cellules contrôles sont traitées de la même façon lors de chaque stress, mais ne sont pas exposées aux UVB.

La dose d'UVB est fixée à 250 mJ/cm² par stress (**Figure II-3**). Ceci est vérifié par l'utilisation d'un radiomètre détectant l'énergie accumulée à 312 nm.

Après le stress, le PBS est décanté et du BME + 1 % FBS est ajouté aux cellules.

Afin de voir apparaître la SIPS, 10 stress successifs sont réalisés à raison de 2 stress/jour pendant 5 jours.

2.2.2 Utilisation d'inhibiteurs dans le modèle de base

2.2.2.1 MATERIEL

- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)
- BME + 1 % FBS (Milieu BME additionné de 1% de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne).
- Pifithrine- α (Alexis Biochemicals, Belgique)
- SP600125 (Signal transduction Laboratories, USA)
- Lampe U.V.B (TL 20 W/01) (Philips, The Netherlands), longueur d'onde 312 nm.

Radiomètre et capteur U.V.B (Bioblock Scientific, Belgique)

2.2.2.2 METHODE

72 heures avant le premier stress, les cellules FS sont repiquées à une confluence de 10 000 cellules/cm² dans du BME + 1% de FBS. Une heure avant le premier stress, les cellules sont incubées avec l'inhibiteur dilué dans du BME + 1% de FBS à des concentrations variant de 0 μ M à 40 μ M pour la pifithrine- α et de 0 μ M à 10 μ M pour le SP600125. Le déroulement des stress est identique au modèle de base.

Après chaque stress, le PBS est décanté et du BME + 1 % FBS, dans lequel l'inhibiteur est dilué, est ajouté aux cellules.

2.3 DETECTION DES BIOMARQUEURS DE LA SENESCENCE

2.3.1 Activité SA β -gal

2.3.1.1 MATERIEL

Le matériel permettant de détecter l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal) est repris dans le **tableau II-1**.

2.3.1.2 METHODE

48 heures après le dernier stress, les cellules sont repiquées à faible densité (1000 cellules/cm²) dans des petites boîtes 6 puits de 35 mm de diamètre (Costar, U.S.A.).

Le lendemain, le milieu est décanté et les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS (2 ml) puis fixées 5 minutes dans 2 ml de solution de fixation. Les cellules sont rincées à nouveau 2 fois avec du PBS et sont ensuite incubées avec 2 ml de solution de coloration pendant 12 à 16 heures à 37°C, sans CO₂ et à l'abri de la lumière.

Quand la coloration est nette, les cellules sont rincées 2 fois au PBS, puis séchées au méthanol.

On peut dès lors déterminer la proportion de cellules positives pour l'activité SA β-gal (cellules bleues) par rapport à l'ensemble de la population cellulaire.

2.3.2 Incorporation de la [³H]-thymidine

2.3.2.1 MATERIEL

- NaOH 0,5M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- HCl 0,5M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Acide trichloroacétique (TCA) 10 % (SDS, France)
- Ethanol 70 % (SDS, France)
- Trypsine 0,25 % (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- BME (Basal Medium Eagle, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- FBS (Sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4).
- Thymidine tritiée (NEN, Boston, U.S.A.)
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)
- Compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, U.S.A.)

2.3.2.2 METHODE

48 heures après le dernier stress, les cellules sont repiquées à une confluence de 10 000 cellules par puit dans une plaque 24 puits dans du milieu BME + 1 % FBS. 24 heures plus tard, du milieu BME + 1% FBS additionné de 1μCi/ml de thymidine tritiée est ajouté aux cellules.

Les boîtes sont ensuite incubées 48 h dans une étuve à 5 % de CO₂ afin de permettre l'incorporation de la thymidine tritiée.

Ensuite, les puits sont rincés 2 fois au PBS, 1 fois au TCA 10 % (préalablement refroidi sur glace), 1 fois à l'éthanol 70 % et 1 fois au PBS.

Ensuite, 250 μl/puits de NaOH 0,5 M sont ajoutés, ce qui permet la lyse des cellules. Après 30 minutes, la réaction est neutralisée en ajoutant 250 μl d'HCl 0,5 M.

Après homogénéisation à la pipette Pasteur, les 500 µl de lyse sont repris dans une fiole contenant 5 ml d'Aqualuma. La fiole est ensuite agitée et placée dans le compteur à scintillation.

2.4 TEST DE VIABILITE CELLULAIRE AU MTT

Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium) et le clivent en son dérivé le formazan. Celui-ci a la caractéristique de former des cristaux de couleur mauve insolubles en milieu aqueux. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En présence d'une molécule toxique, le nombre de cellules capables de réaliser cette réaction diminue. En conséquence, une corrélation peut être établie entre la viabilité cellulaire et la quantité de MTT clivé.

2.4.1 Matériel

- MTT (Sigma, Saint-Louis, U.S.A.) préparé à une concentration stock de 2,5 mg/ml dans du PBS
- SDS 30% (ICN, Biomedicals, U.S.A.)
- N,N-diméthyl-formamide (Janssen Chimica, Belgique)
- Acide acétique 80%

2.4.2 Méthode

La solution de lyse est préparée à partir de 2 volumes de SDS 30% pour un volume de N,N-diméthyl-formamide et cette solution est ensuite portée à pH 4,7 avec de l'acide acétique 1M. Cette solution peut-être conservée à 37°C.

La viabilité cellulaire est évaluée 24 heures après le stress dans une plaque 6 puits. Le milieu est décanté et deux ml de solution de MTT, diluée deux fois dans du BME + 1 % FBS, sont ajoutés. Après une incubation de 2 heures à 37°C, 5 % de CO₂, le surnageant est décanté et 1 ml de solution de lyse est ajouté. Lorsque les cristaux sont solubilisés, l'absorbance est lue à 570 nm au spectrophotomètre (Microplate Imaging System).

2.5 DOSAGE DE PROTEINES

2.5.1 Méthode de Lowry

Les protéines cellulaires peuvent être dosées par la méthode de Lowry . Cette méthode se base sur le principe qu'une fois dénaturées au NaOH, les protéines exposent leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleue est lue à 740 nm au spectrophotomètre (Uvikon 940, Kontron Instruments, Italie) et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

2.5.1.1 MATERIEL

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)

BSA (Bovine Serum Albumin) à 2 mg/ml (Sigma, St-Louis, U.S.A.)

NaOH 0,5 N et 1 N (Merck, Darmstadt Allemagne)

Mixture alcaline à préparer juste avant l'emploi :

- 2 % carbonate de sodium Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt, Allemagne),

- 0,01 % sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- 0,02 % tartrate de sodium/potassium $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Réactif phénol de Folin-Ciocalteu (Sigma, St-Louis, U.S.A.) à diluer 2 fois avec de l'eau avant utilisation.

2.5.1.2 METHODE

Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS. Ensuite, 1 ml de NaOH 0,5 N est ajouté aux cellules pour lyser les cellules et libérer les protéines. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, les lysats sont homogénéisés à la pipette pasteur et sont aliquotés en fractions de 0,4 ml. Par la suite, 2 ml de mixture alcaline sont ajoutés à chaque fraction de 30 secondes en 30 secondes puis les lysats cellulaires sont incubés 15 minutes.

En respectant le temps et l'ordre des tubes, 0,2 ml de réactif de Folin dilué 2 fois sont ajoutés à chaque fraction. Le tout est immédiatement vortexé.

Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à une densité optique (D.O.) de 740 nm.

- La concentration en protéines se calcule en rapportant leur D.O. sur une droite d'étalonnage réalisée avec 4 standards de concentrations connues (0, 50, 100 et 200 mg/ml en BSA).

2.5.2 Méthode de Bradford

2.5.2.1 PRINCIPE

Cette méthode permet de doser la concentration en protéine d'un échantillon par comparaison avec un étalon dont la concentration est connue. Il se base sur une réaction entre le bleu de Coomassie G250 et les protéines de l'échantillon. En milieu acide, le colorant s'adsorbe sur les protéines et son pic maximal d'absorbance passe de 465 à 595 nm (Bradford, 1976).

2.5.2.2 METHODES

1 ml de colorant Bradford (BioRad, Allemagne) dilué 5 X dans de l'eau distillée et filtré est déposé dans des tubes. Ensuite de 30 secondes en 30 secondes, 2 µl d'échantillon dont il faut déterminer la concentration en protéines, y sont ajoutés.

2,5 µl d'un étalon BSA (Bovin Serum Albumin, Pierce, U.S.A.) de concentration connue (2 µg/µl), d'eau distillée et 2 µl tampon de lyse subiront le même traitement. Les échantillons sont ensuite vortexés et la D.O. est lue à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre après 5 minutes d'incubation.

La concentration en protéine des échantillons sera déterminée grâce à l'étalon BSA par la formule suivante :

$$\left(\frac{\text{D.O. échantillon} - \text{D.O. Blanc échantillon}}{\text{D.O. étalon} - \text{D.O. Blanc étalon}} \right) * 5 \mu\text{g}/\text{nombre de } \mu\text{l d'échantillon}$$

2.6 WESTERN BLOT

La technique du Western-blot permet la détection d'une protéine à l'aide d'un anticorps dirigé contre celle-ci. La première étape consiste à séparer les protéines d'un extrait cellulaire en fonction de leur poids moléculaire. Celle-ci est réalisée en chargeant les extraits sur un gel de polyacrylamide (de pourcentage déterminé). Ce gel sera soumis à une différence de potentiel provoquant la migration et donc la séparation des protéines selon leur poids moléculaire. Les plus petites migrent le plus vite. Un marqueur de poids moléculaire composé de diverses protéines de poids moléculaire connu migre en parallèle et permet d'évaluer le poids de la protéine recherchée.

La seconde étape est une étape de transfert. Elle se fait par la migration des protéines contenues dans le gel sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF). Lorsque le matériel se trouve sur cette membrane, celle-ci est soumise à un blocage ce qui permettra de minimiser un bruit de fond dû à des liaisons non spécifiques de l'anticorps primaire à la membrane. Le blocage est souvent réalisé au moyen d'une solution contenant du lait.

Un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt est ajouté. Un contrôle de charge est effectué avec un anticorps dirigé contre une protéine dont l'expression ne varie pas dans les conditions testées.

La troisième étape consiste à incuber la membrane avec un anticorps secondaire dirigé contre les fragments Fc de l'anticorps primaire. Cet anticorps secondaire est couplé à une enzyme : la peroxydase. L'étape de révélation est réalisée en ajoutant le substrat de la peroxydase (peroxyde d'hydrogène) ainsi que du luminol (amplificateur) permettant ainsi l'émission de photons pouvant s'imprimer sur un film autoradiographique.

2.6.1 Récupération des extraits et préparation des échantillons

2.6.1.1 RECUPERATION DES EXTRAITS

2.6.1.1.1 LYSATS CELLULAIRES

2.6.1.1.1.1 Matériel

- Tampon de lyse :
- Urée, 6M (Amersham, Grande Bretagne)
- Thiourée, 2M (Amersham, Grande Bretagne)
- Chaps, 2% (Amersham, Grande Bretagne)
- SB 3-10, 2% (Sigma, U.S.A.)
- DTT, 60 mM (Amersham, Grande Bretagne)
- Pharmalyte 3-10 (Amersham, Grande Bretagne)
- Inhibiteurs de protéases (Roche, Allemagne)

2.6.1.1.1.2 Méthode

Le milieu est décanté et les cellules sont rincées au PBS. Elles sont raclées dans du PBS. Les cellules sont récupérées et centrifugées 10 minutes à 4°C à 1000 rpm. Le culot est ensuite resuspendu dans du tampon de lyse. Les échantillons (20 à 30 µg) sont dilués dans du bleu de charge (sample buffer, 4X, Invitrogen, U.S.A.) et 10 % de DTT y est additionné. Ces échantillons sont alors chauffés à 70°C pendant 10 minutes et centrifugés pendant 3 minutes à 13 000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne). Ils sont ensuite chargés dans les puits du gel de polyacrylamide. De plus 10 µl du marqueur de poids moléculaire coloré, See Blue (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) sont chargés dans un puits voisin afin de pouvoir détecter la

protéine recherchée (**Figure II-4**). Ce marqueur contient un colorant permettant de suivre leur migration.

2.6.1.2 PREPARATION DES GELS ET MIGRATION

Utilisation de minigels (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.).

Celui-ci est composé de 2 types de gels (Acrylamide / bis-Acrylamide 10 % de type nuPage).

- Le « stacking » est un gel qui permet de concentrer les échantillons au fond du puits.
- Le « running » est un gel qui permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

Un tampon de migration est utilisé: le MOPS (NuPage Antioxydant, Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.), à diluer 20 x dans de l'eau distillée.

La cuve est remplie du tampon de migration. Etant donné que les échantillons se trouvent en conditions réductrices, on ajoute de l'antioxydant dilué 1000 fois (NuPage Antioxydant, Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) au tampon central de la cuve afin de maintenir ces conditions durant la migration. La migration dure 1 heure à 200 volts et 400 mA, à voltage constant.

2.6.1.3 TRANSFERT SUR MEMBRANE PVDF

Réalisation de la solution de transfert (200ml):

- 10 ml Nu page transfert buffer (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
 - 200µl d'antioxydant (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
 - 20ml de méthanol (10%) (si on travaille avec un gel)
 - ou
 - 40ml de méthanol (20%) (si on travaille avec deux gels)
- porter à volume avec de l'H₂O distillée

Réalisation du montage pour le transfert :

4 papiers Whatman (Merck, Darmstadt, Allemagne) d'une taille semblable à celle du gel sont rincés dans du tampon de transfert. La membrane (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Uppsala, Suède) de même taille est placée une minute dans du méthanol afin d'augmenter son affinité et cinq minutes dans le tampon de transfert (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.).

Le gel est démoulé et un système "sandwich" (**Figure II-5**) est réalisé pour permettre le transfert des protéines vers la membrane. Le transfert se passe durant 2h30 à 30 Volts et 250 mA, avec un ampérage constant.

2.6.1.4 LE BLOCKING

Réalisation de la solution de blocking :

- 100 ml TBS (Tris Buffer Saline) 10 x concentré (par litre : 24,22 g Tris ; 80,06 g NaCl ; pH 7,4),
- 900 ml H₂O,
- 1 ml tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, U.S.A),
- 2% d'agent bloquant (ECL advanceTM Western Blotting Detection Kit, Blocking Agent, Amersham Biosciences, Grande Bretagne).

- La membrane est mise en rotation pendant 2 heures dans la solution de blocking à température ambiante.

2.6.1.5 INCUBATION AVEC L'ANTICORPS PRIMAIRE

L'anticorps primaire est dilué à bonne concentration dans du TBS-twen 20, 0,1% (TBS-t 0,1%) + 2 % d'agent bloquant. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire avant d'être rincées 3 x 10 minutes avec du TBS-t 0,1%. La liste des anticorps utilisés au cours de ce mémoire est reprise au **tableau II-2**.

2.6.1.6 INCUBATION AVEC L'ANTICORPS SECONDAIRE

L'anticorps est dilué dans du TBS-t 0,1% + 2% d'agent bloquant à bonne concentration. La membrane est incubée 1 heure avec cette solution avant d'être rincée 3 x 10 minutes avec du TBS-t 0,1%. La liste des anticorps utilisés au cours de ce mémoire est reprise au **tableau II-2**.

2.6.1.7 REVELATION

La membrane est incubée pendant 5 minutes avec le substrat de la HRP (ECL advanceTM Western Blotting Detection Kit Amersham Biosciences, Royaume-Unis). Un film autoradiographique (Hyperfilm MP Amersham, Grande-Bretagne) est exposé sur la membrane en chambre noire, pendant des temps variables (de 15 à 20 min) afin d'obtenir image optimale, puis placé dans une solution de révélation (Ilford 200 RT, Ilford, Grande-Bretagne), lavé à l'eau distillée, fixé 4 minutes dans une solution de fixation (Ilford 200 RT, Ilford, Grande-Bretagne). Le film est finalement lavé à l'eau courante.

2.6.1.8 « STRIPPING » DE LA MEMBRANE

Après réalisation de certain western, la membrane a été strippée, c'est-à-dire que tous les anticorps accrochés à celle-ci sont retirés pour qu'elle puisse être réincubée avec un autre anticorps primaire. La solution employée pour ce faire, est le « Restore Western Blot Stripping Buffer » (Pierce, Rockford, U.S.A.), avec laquelle la membrane est incubée 15 minutes sous agitation. Ensuite, celle-ci est rincée au TBS-t avant d'être bloquée.

2.7 EXTRACTION DES PROTEINES NUCLEAIRES

2.7.1 Matériel

Les réactifs employés pour les extractions nucléaires sont repris au **tableau II-3**.

2.7.2 Méthode

Toutes les étapes de cette extraction sont réalisées à 4°C et les tampons sont maintenus sur glace. Les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS puis une fois avec 10 ml de PBS + NaF 5mM+ Na₂MoO₄ 1mM. Ensuite, les cellules sont incubées sur glace pendant 5 minutes dans 10 ml de HB 1X, une solution hypotonique par rapport aux cellules, ce qui permet de fragiliser les membranes. Ensuite, celui-ci est décanté totalement et les cellules sont lysées dans 500 µl de tampon de lyse. Les cellules sont raclées et récupérées dans un eppendorf qu'on centrifuge 30 secondes à 13000 rpm. Le surnageant est éliminé. Toutes ces premières étapes ont permis de récupérer les noyaux. Le culot est suspendu dans 50µl de RE et 50µl de SA, ce qui permettra la libération des protéines nucléaires. Le tout est incubé sur roue au moins 30 minutes à 4°C. S'en suit une centrifugation à 13000 rpm

pendant 10 minutes à 4°C, afin de faire précipiter les débris nucléaires. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré. Une fraction est utilisée pour le dosage protéique par la méthode de Bradford, l'autre est aliquotée et congelée à -70 C°.

2.8 DOSAGE DE LA LIAISON A L'ADN DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION P53, ATF-2 ET AP-1

2.8.1 Principe

Afin de déterminer l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription p53, AP-1 et ATF-2, nous avons réalisé des tests de liaison de ces facteurs à leur séquence consensus. Ceci s'est réalisé dans une plaque 96 puits dont les puits sont tapissés à la streptavidine. Des sondes oligonucléotidiques biotinylées à leur extrémité et contenant la séquence consensus du facteur de transcription étudié y sont déposées. La liaison biotine-streptavidine permet de fixer la sonde au fond du puit. Des extraits nucléaires sont ensuite déposés dans les puits. Si les extraits contiennent le facteur de transcription, celui-ci reconnaît la séquence et s'y fixe. La détection de la liaison se fera par utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre le facteur de transcription. Ensuite, on ajoute un anticorps secondaire dirigé contre le primaire. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase, ce qui permet la révélation de la liaison à l'ADN par colorimétrie. Cette technique est illustrée à la Figure II-6.

2.8.2 Matériel

Les différentes solutions et tampons utilisés lors des tests de liaison à l'ADN sont détaillés dans les **tableaux II-4 à II-6**.

2.8.3 Méthode

2.8.3.1 FIXATION DES SONDES

Les sondes biotinylées et diluées dans du PBS sont déposées dans les puits pré-conditionnés à la streptavidine à une concentration de 4 picomoles par puits. Les puits sont incubés une heure à 37°C. Ensuite, afin d'éliminer les sondes qui ne se seraient pas fixées à la streptavidine, les puits sont lavés deux fois avec 100 µl de PBS bis + Tween 20 0,1% (Sigma Aldrich Chimie, Allemagne) et une fois avec 200 µl d'eau distillée. Le séchage des puits se fait en 1 heure à 37°C. Pour terminer, les puits sont stockés à 4°C.

2.8.3.2 FIXATION DES PROTEINES NUCLEAIRES

Du tampon de liaison est ajouté à chaque puits afin de mimer les conditions nucléaires favorisant la liaison du facteur de transcription à sa séquence. Les extraits nucléaires sont dilués dans du tampon de lyse (les concentrations finales pour ces différents tests se trouvent au **tableau II-7**) et sont déposés dans chaque puits. La plaque multipuits est incubée sous légère agitation pendant une heure à température ambiante. Afin d'éliminer les protéines non fixées à la sonde, chaque puits est lavé 3 fois avec 200 µl de PBS bis + Tween 20 0,1%.

2.8.3.3 FIXATION DE L'ANTICORPS PRIMAIRE

L'anticorps primaire dilué correctement (voir **tableau II-7**) est déposé dans chaque puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, chaque puits est rincé 3 fois avec 200

µl de PBS bis + Tween 20 0,1%. Ce lavage permet d'éliminer les anticorps primaires non fixés.

2.8.3.4 FIXATION DE L'ANTICORPS SECONDAIRE

L'anticorps secondaire dilué correctement (voir **Tableau II-7**) est déposé dans les puits. L'incubation dure une heure à température ambiante. Ensuite, chaque puits est rincé 4 fois avec 200 µl de PBS bis + Tween 20 0,1%. Ce lavage permet d'éliminer les anticorps secondaires non fixés.

2.8.3.5 REVELATION

La détection et la quantification de la liaison du facteur de transcription se fait par quantification de l'activité de la HRP couplée à l'anticorps secondaire. Pour permettre à la HRP d'exercer son activité, 100µl de solution chromogène (TMB, Biosource, Belgique) sont ajoutés à chaque puit. Après dix minutes d'incubation à l'abri de la lumière, 100 µl de solution stop (Biosource, Belgique) sont ajoutés à chaque puit. Cette solution contient de l'H₂SO₄ permettant l'arrêt de la réaction enzymatique. La quantification se fait en mesurant la D.O. des échantillons grâce à un spectrophotomètre à 450 nm (référence 655 nm) (Ultramark, Biorad, U.S.A.).

3 RESULTATS

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié la SIPS induite par les ultraviolets de type B (290-320 nm) chez des fibroblastes humains foetaux de derme.

Nous avons étudié l'état de sénescence des cellules en mettant en évidence deux biomarqueurs de la sénescence, à savoir, l'activité β -galactosidase associée à la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire. Nous avons également cultivé ces mêmes fibroblastes jusqu'à épuisement de leur potentiel prolifératif, et appliqué les mêmes techniques de détection des deux biomarqueurs de la sénescence décrites ci-dessus.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux variations d'expression de protéines liées à la réponse aux stress, telles que $p38^{MAPK}$ et JNK, ou de protéines impliquées dans le cycle cellulaire comme $p21^{WAF-1}$ et p53.

Après avoir démontré l'induction de la sénescence prématurée par les UVB, nous avons mis en évidence l'activation de trois facteurs de transcription, à savoir, p53, AP-1 et ATF-2.

Enfin, afin de pouvoir à plus long terme identifier sur microdamier à ADN les gènes sous contrôle de ces facteurs de transcription dans notre modèle de sénescence prématurée induite par les UVB, nous avons tenté de les inhiber par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques.

3.1 SENESCENCE REPLICATIVE ET INDUCTION PAR LES UVB DE LA SENESCENCE PREMATUREE DES FIBROBLASTES DE DERME AGO4431

Afin d'induire la sénescence prématurée des fibroblastes AGO4431 par les UVB, nous avons stressé ces derniers à raison de deux stress par jour durant cinq jours à une dose de 250 mJ/cm^2 par stress. Ces 5 jours sont suivis de 72 heures de récupération afin de discriminer les réponses à court terme des réponses à long terme. Nous nous sommes assurés au préalable du caractère subcytotoxique du protocole de stress que nous avons appliqué.

Deux types de contrôles ont été réalisés. D'une part, les cellules « jour 0 » (« J0 ») représentent l'état des cellules avant le début des stress. D'autre part, les cellules contrôles (« CTL ») sont quant à elles cultivées et repiquées de la même manière que les cellules stressées, mais ne sont pas exposées aux UVB.

Parallèlement à l'induction de la sénescence prématurée aux UVB, nous avons cultivé ces mêmes cellules AGO4431 jusqu'à épuiser leur potentiel prolifératif.

3.1.1 Détection de l'activité SA β -galactosidase

Afin de nous assurer de l'état sénescence des cellules AGO4431 que nous avons stressées aux UVB ou que nous avons cultivées jusqu'à épuisement de leur potentiel prolifératif, nous avons cherché à détecter l'activité β -galactosidase associée à la sénescence par histochimie.

Nous avons remarqué que la proportion de cellules bleues possédant une activité β -galactosidase à pH 6 augmente d'environ 16 fois dans les cellules en sénescence réplivative (**Graphe III-1, Figure III-1**).

En ce qui concerne les cellules stressées aux UVB, nous constatons une augmentation de la proportion de fibroblastes positifs à l'activité SA β -galactosidase de 3,3 fois par rapport aux contrôles 72 heures après la fin des stress (**Graphe III-2**), ce qui montre que la population cellulaire s'est enrichie en cellules sénescents après les stress aux UVB.

3.1.2 Étude du potentiel prolifératif et de l'arrêt du cycle cellulaire

Une des caractéristiques majeures des cellules en sénescence est l'arrêt irréversible du cycle cellulaire.

Afin d'étudier si les cellules en sénescence réplivative et les cellules stressées aux UVB ont une capacité de prolifération diminuée, nous avons d'une part, réalisé un test d'incorporation de thymidine tritiée ($[^3\text{H}]$ -thymidine) dans l'ADN.

Ensuite, nous avons analysé par la technique du Western Blot l'expression de protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, à savoir, le facteur de transcription p53 et l'inhibiteur de cycline/Cdk p21^{WAF-1}.

3.1.2.1 INCORPORATION DE LA THYMINES TRITIEE

Les fibroblastes AGO4431 en sénescence réplivative montrent une diminution d'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine d'environ 2,5 fois par rapport aux cellules jeunes (**Graphe III-3**).

En ce qui concerne les cellules en sénescence prématurée induite par les UVB, la diminution d'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine est diminuée de 7 fois par rapport aux contrôles 72 heures après la fin des stress (**Graphe III-4**).

Ces résultats indiquent que la synthèse d'ADN est diminuée tant dans les fibroblastes AGO4431 sénescents que dans les cellules stressées, démontrant l'arrêt du cycle cellulaire.

3.1.2.2 MISE EN EVIDENCE DE LA SUREXPRESSION DES PROTEINES P53 ET P21^{WAF-1}

Afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires induisant l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules en sénescence prématurée induite par les UVB, nous avons réalisé un Western Blot afin d'étudier l'expression des protéines p53 et p21^{WAF-1}, deux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire (**Figure III-2**).

Les intensités des bandes correspondant aux protéines p53 et p21^{WAF-1} ont été normalisées par rapport à l'intensité d'une protéine de référence, l' α -tubuline, dont l'expression ne varie pas dans les fibroblastes stressés ou non aux UVB.

Nous observons une augmentation de 2,5 fois de l'expression de la protéine p53 dans les cellules stressées par rapport au contrôle, et ce 4 heures après le dernier stress et de 1,5 fois 72 heures après le dernier stress (**Graphe III-5**).

L'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{WAF-1} est quant à lui surexprimé 1,8 fois à 72 heures après le dernier stress (**Graphe III-6**). Ce résultat n'est pas surprenant, puisque l'expression de p21^{WAF-1} est elle-même sous le contrôle de la protéine p53.

Le fait que le niveau protéique de ces protéines augmente dans nos fibroblastes en SIPS permet d'expliquer la diminution du pouvoir prolifératif observée dans les tests d'incorporation de [³H]-thymidine.

3.2 ÉTUDE DE L'ACTIVITE DE LIAISON A L'ADN DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET DE L'ACTIVATION DE PROTEINES LIEES A LA REPONSE AUX STRESS DANS LA SIPS INDUITE PAR LES UVB

3.2.1 Étude de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription p53, AP-1 et ATF-2

Il est clairement démontré dans la littérature que les facteurs de transcription p53, ATF-2 et AP-1 interviennent dans la réponse aux stress, et en particulier dans la réponse des fibroblastes aux UVB (Rittié *et al.*, 2002 ; She *et al.*, 2002).

Nous avons donc voulu chercher à savoir si ces facteurs de transcription sont impliqués, d'une part, dans la sénescence répliquative des fibroblastes de peau *in vitro*, et d'autre part, dans la régulation de la SIPS induite sous UVB dans ces mêmes cellules stressées aux UVB.

Pour ce faire, nous avons étudié l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription p53, AP-1 et ATF-2 chez des fibroblastes de peau cultivés *in vitro* entrés en sénescence répliquative ou en SIPS induite par les UVB.

En ce qui concerne les fibroblastes AGO4431 sénescents, nous n'avons pas pu montrer une augmentation du taux de liaison à l'ADN des facteurs de transcription p53, ATF-2 et AP-1 (**Graphe III-7**).

Pour les cellules stressées aux UVB, nous avons réalisé une cinétique d'activation des trois mêmes facteurs de transcription au terme du dernier stress. Afin de discriminer les réponses à court, moyen et long terme, les extraits protéiques ont été réalisés 1 heure, 4 heures et 8 heures après le dernier stress (réponse à court terme), 24 et 48 heures après le dernier stress (réponse à moyen terme) et 72 heures après le dernier stress (réponse à long terme).

L'activité de liaison à l'ADN de la protéine p53 augmente dans les temps courts d'une amplitude 3 à 3,5 fois dans les cellules stressées par rapport aux contrôles (**Graphe III-8**). Cette augmentation de liaison à l'ADN se maintient à moyen terme et est de l'ordre de deux fois à long terme (72 heures) après les stress.

AP-1 montre une augmentation de son activité de liaison à l'ADN de 2,5 fois à 2 fois de 1 heure à 72 heures après le dernier stress dans les cellules stressées par rapport aux contrôles (**Graphe III-9**).

Enfin, ATF-2 montre une augmentation de son activité de liaison à l'ADN de 2,5 fois à 1,7 fois de 1 heure à 72 heures après le dernier stress dans les cellules stressées par rapport aux contrôles (**Graphe III-10**).

3.2.2 Étude de l'activation des protéines de réponse aux stress, p38^{MAPK} et JNK, dans la SIPS induite sous UVB

p38^{MAPK} est une protéine jouant un rôle central dans la réponse aux stress des fibroblastes soumis à des stress de type oxydatif ou aux UVB (Ono and Han, 2000).

De plus, une étude réalisée au sein de notre laboratoire a mis en évidence l'implication de p38^{MAPK} dans l'établissement de la SIPS induite sous H₂O₂ (Fripiat *et al.*, 2002).

Il nous a donc semblé intéressant de tester l'implication de la protéine p38^{MAPK} dans la régulation de la SIPS sous UVB des fibroblastes de derme AGO4431 selon notre modèle de stress répétés.

La technique du Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre p38^{MAPK} et contre sa forme phosphorylée ne nous a pas permis de mettre en évidence une activation de la protéine (**Figure III-3**). Dans nos extraits, nous détectons bien la forme totale de la protéine p38^{MAPK}. Par contre, nous ne détectons aucune augmentation de la forme phosphorylée dans les cellules stressées aux UVB. Les résultats ont été normalisés par l'intensité des bandes spécifiques de l' α -tubuline (**Graphe III-11**).

La protéine p38^{MAPK} ne semble donc pas être impliquée dans la SIPS des fibroblastes AGO4431 induite sous UVB.

Les protéines JNK jouent également un rôle clé dans la réponse aux stress des fibroblastes aux UVB (Rittié *et al.*, 2002 ; She *et al.*, 2002). Elles activent en aval les facteurs de transcription AP-1 et ATF-2. Il nous a dès lors paru pertinent de tester si, contrairement à la protéine p38^{MAPK}, ces protéines sont activées dans notre modèle de SIPS induite par les UVB.

Nous avons ainsi pu détecter à l'aide d'anticorps spécifiques les JNK totales et phosphorylées (**Figure III-4**), et mettre en évidence une cinétique d'activation.

En effet, nous observons une augmentation de la forme phosphorylée des JNK dans les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles au cours des 48 premières heures suivant l'arrêt du stress. Après 72 heures, l'activation des JNK n'est plus détectable (**Graphe III-12**).

3.3 MISE AU POINT D'UN MODELE D'INHIBITION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION P53, AP-1 ET ATF-2 LORS DE LA SIPS SOUS UVB

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence que les facteurs de transcription p53, AP-1 et ATF-2 étaient activés lors de la SIPS des fibroblastes AGO4431 induite par les UVB.

Nous avons pour objectif à plus long terme au laboratoire d'identifier des gènes sous contrôle de chacun de ces facteurs de transcription. En effet, cette approche devrait nous permettre de définir les mécanismes moléculaires à la base de l'induction de la sénescence prématurée induite par les UVB dans les fibroblastes de derme. Nous avons donc opté pour une stratégie qui consiste à inhiber l'activité des facteurs de transcription que nous avons mis en évidence, et à identifier les gènes sous leur contrôle sur microdamiers à ADN à partir de fibroblastes AGO4431 stressés ou non aux UVB, avec ou sans inhibition des facteurs de transcription p53, AP-1 et ATF-2 (travail de thèse de C. Borlon).

Dans ce travail, nous avons donc cherché à définir les conditions permettant d'inhiber ces facteurs de transcription au moyen d'inhibiteurs chimiques.

Pour ce faire, nous avons réalisé des tests de viabilité cellulaire (MTT) afin de mettre en évidence une toxicité éventuelle de ces molécules. Les fibroblastes AGO4431 ont été stressés pendant 5 jours à raison de deux stress par jour à 250 mJ/cm². L'inhibiteur est dilué dans le milieu de culture. Les cellules sont incubées avec celui-ci 1 heure avant le premier stress, puis le milieu comportant l'inhibiteur et ajouté après chaque stress. Les tests de viabilité cellulaire ont été réalisés 72 heures après le dernier stress.

Pour les facteurs de transcription AP-1 et ATF-2, nous avons analysé leur activité de liaison à l'ADN en présence ou en absence de l'inhibiteur afin de mettre en évidence une chute d'activation de ces facteurs de transcription liée à la présence de l'inhibiteur.

En ce qui concerne la protéine p53, nous avons testé si la présence de l'inhibiteur entraîne ou non une chute de son expression par Western-Blot, et avons démontré que l'inhibition de p53 a pour conséquence une diminution de la quantité de la protéine p21^{WAF-1} dont l'expression est sous contrôle de p53.

3.3.1 Inhibition de p53 par la pifithrine- α

3.3.1.1 MISE AU POINT D'UN MODELE D'INHIBITION

La pifithrine- α est un inhibiteur chimique de la protéine p53. Celle-ci bloque son domaine de transactivation et empêche donc l'expression des gènes sous la dépendance de p53 (Rocha *et al.*, 2003).

Afin de tester l'éventuelle toxicité de la pifithrine- α sur les fibroblastes AGO4431 soumis aux UVB selon notre modèle de stress, nous avons réalisé une courbe de cytotoxicité en présence ou non d'inhibiteur, à raison de 20 μ M et 40 μ M respectivement. Ces concentrations sont généralement reprises dans la littérature (komarov *et al.*, 1999, Lin *et al.*, 2002 ; Komarova *et al.*, 2003).

Nous avons ainsi montré que les deux concentrations testées ne présentent pas de toxicité sur les fibroblastes AGO4431, qu'ils soient soumis ou non aux UVB (**Graphes III- 13**). En effet, la viabilité des fibroblastes soumis ou non aux UVB en présence de pifithrine- α est comparable à celle des cellules qui n'ont pas été incubées avec l'inhibiteur.

Suite à ces résultats, nous avons choisi de travailler à une concentration de 25 μ M pour inhiber p53, car celle-ci se trouve dans l'intervalle de concentrations testées, et qu'elle n'est donc pas toxique.

3.3.1.2 VERIFICATION DU MODELE D'INHIBITION DE P53

Avant de démontrer l'inhibition par la pifithrine- α de l'activité transactivatrice de la protéine p53 dans notre modèle, il fallait d'abord montrer que la pifithrine- α ne modifiait pas la quantité protéique de p53 par Western-Blot.

Les résultats montrent que p53 est bien présent dans les fibroblastes AGO4431 soumis aux UVB, à court terme et sans inhibiteur, et que la quantité totale de p53 n'est pas diminuée dans les cellules soumises aux UVB en présence de pifithrine- α (**Figure III-5, Graphe III-14**),

Nous avons estimé si la l'inhibition de p53 par pifithrine- α pouvait modifier le niveau d'expression de p21^{WAF-1} qui est sous contrôle de p53.

Notre analyse montre que l'expression p21^{WAF-1} est augmentée lorsque les fibroblastes AGO4431 sont soumis aux UVB (2 heures après le stress). En présence de l'inhibiteur, nous constatons que la quantité de p21^{WAF-1} est également augmentée, mais dans une moindre mesure. A plus long terme, l'inhibition de p53 ne semble plus efficace puisque le niveau protéique de p21^{WAF-1} ne semble plus affecté par la présence de l'inhibiteur (**Graphe III-15**).

Nos résultats suggèrent donc que la pifithrine- α à une concentration de 25 μ M entraîne une inhibition de l'activité transactivatrice de p53 à court terme, mais qu'au delà de deux heures après la fin du dernier stress, notre modèle d'inhibition se révèle inefficace.

3.3.2 Inhibition indirecte des facteurs de transcription ATF-2 et AP-1 par l'inhibiteur des JNK SP600125

3.3.2.1 MISE AU POINT D'UN MODELE D'INHIBITION

Il n'existe pas d'inhibiteur chimique agissant directement sur ATF-2, ni sur AP-1. Cependant, ces facteurs de transcription sont activés par les JNK et ou par p38^{MAPK} en réponse à une exposition aux UV (Rittié, *et al.*, 2002). Nous avons montré précédemment que, contrairement à p38^{MAPK}, les JNK étaient activées dans notre modèle. En conséquence, nous avons inhibé ATF-2 et AP-1 de façon indirecte en inhibant les JNK à l'aide de l'inhibiteur chimique SP600125. Il s'agit d'un inhibiteur qui entrera en compétition pour l'ATP avec les JNK (Bennett *et al.*, 2001).

Afin de tester la toxicité de l'inhibiteur SP600125 sur les fibroblastes AGO4431, deux concentrations ont été testées, à savoir, 5 μ M et 10 μ M. Ces concentrations sont couramment reprises dans la littérature (Bennett *et al.*, 2001 ; Bogoyevitch *et al.*, 2004). Les tests de viabilité cellulaire (MTT) ont montré que les cellules étaient sensibilisées par la présence de l'inhibiteur aux concentrations testées (**Graphe III-16**). En effet, une forte mortalité est observée sur les fibroblastes AGO4431 en présence de l'inhibiteur par rapport aux cellules cultivées sans inhibiteur. Lorsque les cellules sont stressées aux UVB, la présence de

l'inhibiteur a pour effet de diminuer encore plus la viabilité cellulaire des cellules stressées par rapport aux cellules soumises aux stress UVB sans inhibiteur. Ces résultats suggèrent que l'activation des JNK constitue une réponse essentielle pour la survie des cellules AGO4431 lorsqu'elles sont soumises à des stress répétés sous UVB. Cette méthode indirecte d'inhibition d'ATF-2 et d'AP-1 ne pouvant être utilisée dans notre modèle, il serait intéressant d'envisager d'autres techniques d'inhibition comme les dominants négatifs ou le système RNAi.

4 DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre laboratoire étudie depuis plusieurs années la réponse aux stress à long terme des fibroblastes en culture. Au cours de ces dernières années, nous avons montré que l'exposition de fibroblastes diploïdes humains à des stress de faibles intensités au *t*-BHP, au peroxyde d'hydrogène à l'éthanol ou aux UVB ont pour effet d'induire à long terme l'apparition de biomarqueurs de la sénescence (activité β -galactosidase associée à la sénescence, perte du potentiel prolifératif, modification de l'expression génique, etc.). Cette réponse à long terme des cellules a été appelée sénescence induite prématurément par les stress ou SIPS. Les modèles initiaux sur les fibroblastes de poumons fœtaux WI38 et IMR-90 ont été étendus aux mêmes fibroblastes immortalisés en culture par transfection stable de la sous-unité catalytique de la télomérase, ainsi qu'aux fibroblastes de peau fœtaux la souche BJ (de Magalhaes *et al.*, 2002) et AG04431 (Chainiaux *et al.*, 2002a).

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'étude et la caractérisation de la sénescence prématurée des fibroblastes de derme de la souche AG04431 exposés à des doses subcytotoxiques répétées aux UVB.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'exposition des fibroblastes AG04431 soumis à 10 stress sous UVB de 250 mJ/cm² à raison de 2 stress par jour pendant cinq jours a bien pour effet d'induire à long terme les biomarqueurs de la sénescence. En parallèle, nous avons cultivé ces mêmes fibroblastes jusqu'au terme de leur vie proliférative.

Nous nous sommes d'abord concentrés sur la mise en évidence de l'activité SA β -gal et de la perte du potentiel prolifératif.

Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'activité SA β -gal, tant dans les cellules sénescents que dans les cellules stressées par les UVB par rapport aux cellules jeunes ou non stressées. Les résultats concernant le taux d'incorporation de la [³H]-thymidine dans les fibroblastes sénescents ou soumis aux stress montrent une diminution du pouvoir prolifératif de ces cellules par rapport aux cellules jeunes ou non soumises aux stress. Cette diminution du potentiel prolifératif est plus marquée dans les cellules en SIPS.

Nous concluons de nos premières expériences que l'exposition des fibroblastes AG04431 aux UVB selon le schéma de stress décrit ci-dessus a bien pour effet d'induire la sénescence prématurée de ces fibroblastes.

Afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux UVB, nous nous sommes intéressés à mettre en évidence des changements du niveau protéique de deux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire, à savoir les protéines p53 et p21^{WAF-1}. Par Western Blot, nous avons établi une cinétique de modification d'expression de ces deux régulateurs du cycle cellulaire après les stress. Les stress aux UVB entraînent une augmentation rapide du niveau cellulaire de p53. Celle-ci est observée à court terme, 1 heure après le dernier stress. L'expression de p21^{WAF-1} est quant à elle augmentée à plus long terme (72 heures) après la fin des stress. La littérature nous renseigne sur le fait que p53 est activé par des stress génotoxiques. Vu que les UVB

tombent dans cette catégorie, il est possible de mettre en relation l'activation de p53 avec l'exposition répétée des fibroblastes aux UVB. p53 active alors l'expression des gènes sous sa dépendance, telle que p21^{WAF-1} (May *et al.*, 1999).

Le contrôle de p53 sur l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{WAF-1} pourrait expliquer le profil d'expression plus tardif de ce dernier que nous avons mis en évidence par Western Blot.

Nous concluons de nos expériences que le gène suppresseur de tumeur, p53 et l'inhibiteur de complexe cycline/ CdK p21^{WAF-1} sont bel et bien impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire des fibroblastes AG04431 soumis à des stress subcytotoxiques répétés aux UVB.

Au cours de la seconde partie de ce travail, nous avons cherché à définir le profil d'activation de certains facteurs de transcription. En effet, afin de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de la SIPS aux UVB, nous nous sommes intéressés à trois facteurs de transcription connus dans la littérature pour être activés par les stress, à savoir, p53, ATF-2 et AP-1. Par la technique de détection de la liaison à l'ADN en microplaque, nous avons pu montrer une activation de ces trois facteurs suite aux stress, avec des profils d'activation différents pour chacun des facteurs.

Nous avons en effet remarqué une activation majeure de p53 dans les temps courts après les stress. Cette activation peut-être mise en relation avec les dommages à l'ADN causés par les UVB. Ces données sont en corrélation avec les résultats obtenus par Western Blot qui montrent une augmentation du niveau protéique de p53 à court terme après les stress. Il est de plus bien démontré que p53 peut-être activé par les JNK et ou p38^{MAPK} en réponse aux UV (She *et al.*, 2000 ; She *et al.*, 2002). Ces observations soulèvent l'intérêt de démontrer une activation de ces kinases dans notre modèle de stress répétés aux UVB sur les fibroblastes AG04431.

Afin d'identifier le rôle de p53 dans la SIPS induite sous UVB, nous avons mis au point un modèle d'inhibition de celui-ci en utilisant un inhibiteur chimique, la pifithrine- α . Cette molécule ne présente pas de toxicité pour les fibroblastes et à une concentration de 25 μ M, elle inhibe l'activité transactivatrice de p53. Les résultats d'un Western Blot réalisé sur p53 et la CdKI p21^{WAF-1} montrent un niveau protéique de p53 non modifié, et une diminution du niveau d'expression de la protéine CdKI p21^{WAF-1} uniquement deux heures après la fin des stress. Ce modèle doit être complété pour obtenir une inhibition complète de p53 jusque 72 heures après le dernier stress.

De ces résultats, nous concluons que le modèle utilisé pour inhiber p53 au moyen de la pifithrine- α semble efficace uniquement à court terme, vu la diminution d'expression de p21^{WAF-1} 2 heures après le dernier stress.

Concernant ATF-2, il est bien démontré que celui-ci est bien activé suite à des stress génotoxiques et que son activation a pour effet de stimuler l'expression de c-jun (van Dam *et al.*, 1995). De plus, l'implication de ce facteur de transcription dans la sénescence prématurée des fibroblastes IMR-90 est clairement démontrée (Frippiat *et al.*, 2002). En effet, suite à un stress unique à l'H₂O₂, l'activation d'ATF-2 conduit à la surexpression de gènes associés à la sénescence, tels que l'apolipoprotéine J, SM22, la fibronectine et l'ostéonectine. De plus, Chainiaux *et al.* (Chainiaux *et al.*, soumis) ont montré par RT-PCR une surexpression de l'apolipoprotéine J, SM22, la fibronectine et l'ostéonectine dans le modèle de SIPS sous UVB suite à 10 stress.

Suite à ces observations, il nous semblait pertinent d'analyser le rôle d'ATF-2 dans notre modèle de SIPS des fibroblastes AG04431 soumis aux UVB. Les résultats montrent qu'ATF-2 est activé à court, moyen et long terme après le dernier stress, avec une activation plus forte à court terme (1 heure).

Il est donc possible qu'ATF-2 soit aussi responsable de la surexpression de ces gènes liés à la sénescence dans notre modèle. En inhibant ce facteur de transcription par des inhibiteurs chimiques, il serait possible de vérifier si ces gènes sont sous le contrôle d'ATF-2 dans notre modèle de stress sous UVB.

Quant au facteur de transcription AP-1, nous savons que celui-ci est impliqué dans le photo-vieillissement de la peau (Rittié *et al.*, 2002). En accord avec ces observations, nous montrons l'activation d'AP-1 suite aux stress répétés aux UVB, et ce, à court, moyen et long terme après le dernier stress. Par contre, AP-1 n'est pas activé dans les cellules AG04431 en sénescence répllicative. L'activation d'AP-1 par les UV a pour effet d'augmenter l'expression de métalloprotéinases qui vont dégrader la matrice extracellulaire (Rittié *et al.*, 2002), ce qui entraîne les modifications physiologiques caractéristiques du photo-vieillissement (rides profondes, perte d'élasticité,...) (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 2000). Or, il a été montré que le niveau relatif d'expression des métalloprotéinases MMP 1 et MMP 2 était augmenté suite à la SIPS par les UVB (Chainiaux *et al.*, soumis). L'activation d'AP-1 que nous détectons ici est probablement responsable de l'expression de ces métalloprotéinases. Le modèle de SIPS induite par les UVB partage donc des caractéristiques communes avec ce qui est observé lors du photo-vieillissement de la peau *in vivo*.

Les résultats obtenus quant à l'activation des facteurs de transcription AP-1, ATF-2 et p53, sur les fibroblastes AG04431 en sénescence répllicative, ne suggèrent pas l'implication de ces facteurs de transcription dans la sénescence répllicative *in vitro* de ces fibroblastes. En effet, nous n'observons pas d'activation du facteur de transcription p53. Comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, l'activation de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 est réprimée dans les cellules sénescents, ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui montrent que ce facteur de transcription a un niveau de liaison à l'ADN diminué dans les fibroblastes sénescents (Dimri *et al.*, 1996).

Enfin, ATF-2 est un facteur de transcription impliqué dans la réponse aux stress, mais nous n'avons pu montrer son activation en sénescence répllicative.

Dans la troisième partie de ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires de transduction du signal en amont de l'activation des facteurs de transcription ATF-2, AP-1 et p53 et avons cherché à mettre en évidence l'activation des kinases de stress p38^{MAPK} et JNK.

Nous nous sommes d'abord intéressés à la protéine p38^{MAPK}, protéine de réponse aux stress (Ono *et al.*, 2000), impliquée dans l'apparition de la SIPS sous H₂O₂ (Fripiat, 2002). Contrairement aux fibroblastes de poumons fœtaux WI-38, stressés à l'H₂O₂, nous n'avons pas pu mettre en évidence la phosphorylation de p38^{MAPK} dans les fibroblastes du derme AG04431 stressés aux UVB. Nous avons donc tenté d'identifier une autre voie de signalisation pouvant aboutir à l'activation des facteurs de transcription impliqués dans notre modèle. Il est bien démontré que la voie des JNK est une autre voie de signalisation de réponse aux UVB et qu'elle peut activer ATF-2, p53 et Elk-1 (Bogoyevitch *et al.*, 2004). En conséquence, nous avons vérifié l'implication des JNK dans notre modèle.

Nos résultats montrent une activation des JNK dans les fibroblastes AG04431 soumis aux UVB. Il est donc tentant d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'activation des JNK a pour effet d'activer les facteurs de transcription AP-1, p53 et ATF-2 dans notre modèle.

L'activation de ces facteurs serait par contre indépendante de la protéine p38^{MAPK}. De plus, l'activation des JNK dans notre modèle représente une réponse indispensable à la survie des cellules. Nous montrons que l'inhibition des JNK, par l'inhibiteur chimique SP600125, entraîne une mortalité cellulaire tant chez les fibroblastes AG04431 non stressés que soumis aux UVB. Cette mortalité est plus importante dans chez les cellules stressées. Nous concluons donc que l'activation des JNK représente un élément clé dans la réponse au stress permettant la survie des cellules.

En conclusion, nous avons montré que le fait de soumettre les fibroblastes AG04431 à 10 stress répétés à des doses subcytotoxiques d'UVB à raison de deux stress par jour pendant cinq jours entraîne l'apparition de biomarqueurs de la sénescence, à savoir, une augmentation de l'activité SA β -gal et la perte du potentiel prolifératif.

Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression protéique des protéines p53, p21^{WAF-1} et avons montré l'activation des facteurs de transcription AP-1, ATF-2 et p53 par les UVB. Nous avons également montré l'implication des JNK dans l'apparition de la sénescence prématurée induite par les UVB.

En perspective de ce travail, nous pouvons envisager d'autres techniques d'inhibition des JNK étant donné que le SP600125 a un effet toxique sur les FS AG04431. D'une part, nous pouvons projeter d'inhiber les JNK au moyen de dominants négatifs. D'autre part, la technique du RNAi semble être une autre méthode appropriée. Ces deux techniques nécessiteront une étape de transfection. La transfection rétrovirale est une technique caractérisée par une haute efficacité qui a déjà été utilisée avec succès au laboratoire lors de diverses études fonctionnelles. En conséquent, la transfection rétrovirale, associée aux dominants négatifs ou au RNAi, représente une autre technique adaptée à notre modèle de sénescence induite par les UVB dans le but d'inhiber les JNK.

Ensuite, il s'agira d'identifier les gènes de défense ou anti-apoptotique sous contrôle des facteurs de transcription ATF-2, AP-1 et p53 qui pourraient favoriser la survie des fibroblastes AG04431 suite à l'exposition des cellules aux UVB. Pour cela, les damiers à ADN représentent un outils d'analyse moléculaire approprié. Nous proposons donc de réaliser des hybridations sur damier à ADN d'échantillons issus de fibroblastes de derme exposés ou non aux UVB et incubés ou non avec l'inhibiteur de p53 ou dont la voie d'ATF-2 et d'AP-1 est inhibée ou pas.

5 Bibliographie

- Angel, P., Szabowski, A. and Schorpp-Kistner, M. (2001) Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, **20**, 2413-2423.
- Atadja, P.W., Stringer, K.F. and Riabowol, K.T. (1994) Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging. *Mol Cell Biol*, **14**, 4991-4999.
- Baumgartner, B., Heiland, S., Kunze, N., Richter, A. and Knippers, R. (1994) Conserved regulatory elements in the type I DNA topoisomerase gene promoters of mouse and man. *Biochim Biophys Acta*, **1218**, 123-127.
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P.I. (1988) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5112-5116.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., C.P., C., G.B., M., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998) Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Sciences*, **279**.
- Bogoyevitch, M.A., Boehm, I., Oakley, A., Ketterman, A.J. and Barr, R.K. (2004) Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, **1697**, 89-101.
- Campisi, J. (1997) The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer*, **33**, 703-709.
- Chainiaux, F., Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002a) UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1331-1339.
- Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002b) Exposure of human skin diploid fibroblasts to repeated subcytotoxic doses of ultraviolet-B induces the overexpression of transforming growth factor-beta1 mRNA. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 44-48.
- Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O. and Dilley, T. (2000) Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci*, **113** (Pt 22), 4087-4097.
- Clark, D. and Coker, R. (1998) Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*, **30**, 293-298.
- Cohen, D.R. and Curran, T. (1989) The structure and function of the fos proto-oncogene. *Crit Rev Oncog*, **1**, 65-88.
- Connie, M.L., Weindruch, R. and Aikens, J.D. (1997) Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**, 1259-1269.
- De Caprio, J.A., Ludlow, J.W., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Piwinica-Worms, H., Huang, C.M. and Livingston, D.M. (1989) The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell*, **58**, 1085-1095.
- de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002a) Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, **523**, 157-162.
- de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002b) Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Letters* **26263**, 1-6.

-
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Reed, S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, **76**, 1013-1023.
- Dumont, P., Balbeur, L., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000) Appearance of biomarqueurs of in vitro ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1 and TNF- α : senescence associated β -galactosidase activity and morphotype transition. *J. Anat.*, **197**, 529-539.
- Dumont, P., Royer, V., Pascal, T., Dierick, J.F., Chainiaux, F., Fripiat, C., de Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett*, **502**, 109-112.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. and Elledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*, **7**, 555-569.
- Fisher, G.J. and Voorhees, J.J. (1998) Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **3**, 61-68.
- Fripiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, **33**, 1334-1346.
- Fuchs, J. and Packer, L. (1991) Photooxidative stress in the skin. *Oxidants and antioxidants*, 559-583.
- Gerland, L.M., Ffrench, M. and Magaud, J.P. (2001) Inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines et sénescence répllicative. *Pathol Biol*, **49**, 830-839.
- Goldstein, S. (1990) Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*, **249**, 1129-1133.
- Gonos, E.S., Derventzi, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassem, M., Clark, B.F., Jat, P.S. and Rattan, S.I. (1998) Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res*, **240**, 66-74.
- Good, L., Dimri, G.P., Campisi, J. and Chen, K.Y. (1996) Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F components in human diploid fibroblasts during growth and senescence. *J Cell Physiol*, **168**, 580-588.
- Hadari, Y.R., Kouhara, H., Lax, I. and Schlessinger, J. (1998) Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol*, **18**, 3966-3973.
- Hanson, K.M. and Simon, J.D. (1998) Epidermal trans-urocanic acid and the UVA- induced photoaging of the skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10576-10578.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Hayakawa, J., Depatie, C., Ohmichi, M. and Mercola, D. (2003) The activation of c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. *J Biol Chem*, **278**, 20582-20592.
- Hayflick, L. (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, **37**, 614-636.

-
- Hengstschlager, M., Braun, K., Soucek, T., Miloloza, A. and Hengstschlager-Ott, E. (1999) Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res.*, **436**, 1-9.
- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*, **15**, 2672-2681.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. and Horikawa, T. (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology*, **189**, 21-39.
- Jenkins, G. (2002) Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev*, **123**, 801-810.
- Kim, S.J., Wagner, S., Liu, F., O'Reilly, M.A., Robbins, P.D. and Green, M.R. (1992) Retinoblastoma gene product activates expression of the human TGF-beta 2 gene through transcription factor ATF-2. *Nature*, **358**, 331-334.
- Komarov, P.G., Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Christov-Tselkov, K., Coon, J.S., Chernov, M.V. and Gudkov, A.V. (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*, **285**, 1733-1737.
- Komarova, E.A., Neznanov, N., Komarov, P.G., Chernov, M.V., Wang, K. and Gudkov, A.V. (2003) p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem*, **278**, 15465-15468.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, **113** (Pt 20), 3613-3622.
- Leblanc, V. and May, P. (2002) Activation et modifications post-traductionnelles de p53. *Medecine Sciences*, **18**, 577-584.
- Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S.I. and Harlow, E. (1992) Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev*, **6**, 1874-1885.
- Li, A.G., Koster, M.I. and Wang, X.J. (2003) Roles of TGF beta signaling in epidermal/appendage development. *Cytokines and growth factor Reviews*, **14**, 99-111.
- Li, G. and Ho, V.C. (1998) p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol*, **139**, 3-10.
- Lin, Y., Criscuolo Waldman, B. and Waldman, A.S. (2002) Suppression of high-fidelity double-strand break repair in mammalian chromosome by pifithrin-alpha, a chemical inhibitor of p53. *DNA Repair*, **2**, 1-11.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P. and Darnell, J. (1995) *Molecular cell biology*.
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. and Kato, J.Y. (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **14**, 2066-2076.
- May, P. and May, E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, **18**, 7621-7636.
- Moustakas, A., Souhelnytskyi, S. and Heldin, C.H. (2001) Smad Regulation in TGF-beta signal transduction. *Journal of Cell Sciences*, **114**, 4359-4369.
- Naegeli, H. (1997) *DNA structure : inherent instability and genotoxic reactions, in "Mechanisms of DNA damage recognition in mammalian cells*.
- New, L. and Han, J. (1998) The p38 MAP Kinase pathway and its biological function. *TCM*, **8**, 220-228.
- Ono, K. and Han, J. (2000) The p38 signal transduction pathway activation and function. *cellular signalling*, 1-13.

-
- Parry, D., Bates, S., Mann, D.J. and Peters, G. (1995) Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *Embo J*, **14**, 503-511.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, **22**, 153-183.
- Pellegata, N.S., Antoniono, R.J., Redpath, J.L. and Stanbridge, E.J. (1996) DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15209-15214.
- Rhodes, D., Fairall, L., Simonsson, T., Court, R. and Chapman, L. (2002) Telomere architecture. *EMBO Rep*, **3**, 1139-1145.
- Rittié, L. and Fisher, G.J. (2002) UV-light induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews*, **1**, 705-720.
- Rocha, S., Campbell, J.K., Roche, K.C.a. and Perkins, N.D. (2003) The p53-inhibitor Pifithrin-a inhibits Firefly Luciferase activity in vivo and in vitro. *BMC Mol Biol*. 2003; 4 (1): 9, 4, 9.
- Rohde, M., Warthoe, P., Gjetting, T., Lukas, J., Bartek, J. and Strauss, M. (1996) The retinoblastoma protein modulates expression of genes coding for diverse classes of proteins including components of the extracellular matrix. *Oncogene*, **12**, 2393-2401.
- Rosette, C. and Karin, M. (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*, **274**, 1194-1197.
- Sano, Y., Tokitou, F., Dai, P., Maekawa, T., Yamamoto, T. and Ishii, S. (1998) CBP alleviates the intramolecular inhibition of ATF-2 function. *J Biol Chem*, **273**, 29098-29105.
- Scharffetter-Kochanek, K., Brenneissen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W.Y., Kuhr, L., Meewes, C. and Wlaschek, M. (2000) Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental Gerontology*, **35**, 307-316.
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 72-76.
- She, Q.B., Ma, W.Y. and Dong, Z. (2002) Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. *Oncogene*, **21**, 1580-1589.
- She, Q.B., N., C. and Dong, D. (2000) ERKS and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem*, **275**, 20444-20449.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Robetorye, R.S., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. (1991) Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11012-11016.
- Steinmuller, L. and Thiel, G. (2003) Regulation of gene transcription by a constitutively active mutant of activating transcription factor 2 (ATF2). *Biol Chem.*, **384**, 667-672.
- Stevens and Lowe. (1997) *Histologie humaine*.
- Toussaint, O., Medrano, E.E. and von Zglinicki, T. (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, **35**, 927-945.
- Toussaint, O., Michiels, C., Raes, M. and Remacle, J. (1995) Cellular aging and the importance of energetic factors. *Exp Gerontol*, **30**, 1-22.
- Toussaint, O., Raes, M. and Remacle, J. (1991) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech Ageing Dev*, **61**, 45-64.
- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Royer, V. and Chainiaux, F. (2002) From the Hayflick mosaic to the mosaics of

-
- ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1415-1429.
- Tyrrell, R. (1995) Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem Soc Symp*, **61**, 47-53.
- Urquidi V, Tarin D and S., G. (2000) Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu Rev Med.*, **5**, 65-79.
- Vaishnav, D., Jambal, P., Reusch, J.E. and Pugazhenti, S. (2003) SP600125, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase, activates CREB by a p38 MAPK-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, **307**, 855-860.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. and Angel, P. (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *Embo J*, **14**, 1798-1811.
- Verrecchia, F. and Mauviel, A. (2002) Transforming Growth Factor-beta Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation. *Journal of Investigative Dermatology*, **118**, 211.
- Wong, H. and Riabowol, K. (1996) Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol*, **31**, 311-325.
- Yoshiki, M. (1995) Photoageing from an oxidative standpoint. *Journal of Dermatological Science*, **9**, 79-86.

4 TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| 4.1.1.1 1. INTRODUCTION | 1 |
| <i>4.1.1.2 1.1 LA SENESENCE REPLICATIVE ET LA SENESENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR LES STRESS</i> | 1 |
| 1.1.1 Définition de la sénescence répllicative et limite de Hayflick | 1 |
| 1.1.2 La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) | 1 |
| 1.1.3 Biomarqueurs cellulaires et moléculaires observés en sénescence répllicative et en SIPS | 2 |
| <i>1.1.3.1 Les morphotypes</i> | 2 |
| <i>1.1.3.2 L'activité β-galactosidase associée à la sénescence (SA β-gal)</i> | 3 |
| <i>1.1.3.3 Régulation et arrêt du cycle cellulaire</i> | 3 |
| 1.1.3.3.1 Généralités | 3 |
| 1.1.3.3.2 Mécanismes moléculaires régulant l'arrêt définitif du cycle cellulaire | 5 |
| 1.1.3.3.2.1 Répression des gènes de réponse précoce aux mitogènes | 5 |
| 1.1.3.3.2.2 Répression de la phase G1/S | 6 |
| 1.1.3.3.2.3 Répression de cyclines et kinases dépendantes de cyclines | 6 |
| 1.1.3.3.2.4 Induction de la synthèse d'inhibiteurs des kinases dépendantes de cyclines | 6 |
| 1.1.3.3.2.5 Arrêt de la prolifération des cellules en SIPS | 6 |
| <i>1.1.3.4 Raccourcissement des télomères</i> | 6 |
| <i>1.1.3.5 Variation d'expression génique</i> | 7 |
| <i>1.1.3.6 Altération du génome mitochondrial</i> | 7 |
| 1.1.4 Le Transforming Growth Factor β -1 et SIPS | 8 |
| 1.2 Ultraviolets et réponses cellulaires | 9 |
| 1.2.1 Structure de la peau | 9 |
| 1.2.2 Le vieillissement de la peau | 9 |
| 1.2.3 Les ultraviolets | 10 |

| | |
|--|--------|
| 4.1.1.3 1.2.4 LES ULTRAVIOLETS ET LES DOMMAGES CELLULAIRES | 11 |
| <i>1.2.4.1 Les réactions photosensibles de type I et II</i> | 11 |
| <i>1.2.4.2 Les dommages directs à l'ADN</i> | 11 |
| 1.2.5 Les voies de transduction du signal induites par les UV | 12 |
| <i>1.2.5.1 Activation des récepteurs membranaires</i> | 12 |
| <i>1.2.5.2 Activation de la voie des MAP kinases</i> | 12 |
| <i>1.2.5.3 Protéines et facteurs de transcription impliqués dans les réponses cellulaires aux ultraviolets</i> | 13 |
| 1.2.5.3.2 Le facteur de transcription AP-1 | 13 |
| 1.2.5.3.2 Le facteur de transcription ATF-2 | 14 |
| 1.2.5.3.3 La famille des protéines p38 ^{MAPK} | 14 |
| 1.2.5.3.4 Le gène suppresseur de tumeur p53 | 15 |
| 4.1.1.3.1 <u>OBJECTIFS DU MEMOIRE</u> | 17 |
| 2. Matériel et Méthodes | 18 |
| 2.1 Culture de fibroblastes FS | 19 |
| 2.1.2 Repiquage des fibroblastes | 18 |
| <i>2.1.1.1 Matériel</i> | 18 |
| <i>2.1.1.2 Repiquage</i> | 18 |
| <i>2.1.1.3 Comptage des cellules</i> | 18 |
| 2.1.2 Congélation et décongélation des fibroblastes | 19 |
| <i>2.1.2.1 Congélation</i> | 19 |
| <i>2.1.2.2 Décongélation</i> | 19 |
| 2.2 Stress subcytotoxiques aux UVB | 19 |
| 4.2 2.2.1 MODELE DE BASE | 19 |
| 4.3 2.2.1.1 MATERIEL | 19 |
| 4.4 2.2.1.2 METHODES | 19 |
| 2.2.2 Utilisation d'inhibiteurs dans le modèle de base | 20 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2.1 Matériel | 20 |
| 2.2.2.2 Méthodes | 20 |
| 2.3 Détection des biomarqueurs de la sénescence | 20 |
| 2.3.1 Activité SA β -gal | 20 |
| 2.3.1.1 Matériel | 20 |
| 2.3.1.2 Méthodes | 20 |
| 2.3.2 Incorporation de la [3 H]-thymidine | 20 |
| 2.3.2.1 Matériel | 20 |
| 2.3.2.2 Méthodes | 20 |
| 2.4 Test de viabilité cellulaire au MTT | 21 |
| 4.5 2.4.1 MATERIEL | 21 |
| 2.4.2 Méthodes | 21 |
| 4.6 2.5 DOSAGE DE PROTEINES | 22 |
| 2.5.1 Méthode de Lowry | 22 |
| 2.5.1.1 Matériel | 22 |
| 2.5.1.2 Méthode | 22 |
| 2.5.2 Méthode de Bradford | 22 |
| 2.5.2.1 Principe | 22 |
| 2.5.2.2 Méthodes | 22 |
| 2.6 Western Blot | 23 |
| 2.6.1 Récupération des extraits et préparation des échantillons | 23 |
| 2.6.1.1 Récupération des extraits | 23 |
| 2.6.1.1.1 Lysats cellulaires | 23 |
| 2.6.1.1.1.1 Matériel | 23 |
| 2.6.1.1.1.2 Méthodes | 23 |
| 2.6.1.2 Préparation des gels et migration | 24 |
| 2.6.1.3 Transfert sur membrane PVDF | 24 |
| 2.6.1.4 Le blocking | 24 |
| 2.6.1.5 Incubation avec l'anticorps primaire | 25 |
| 2.6.1.6 Incubation avec l'anticorps secondaire | 25 |

| | |
|--|----|
| 2.6.1.7 Révélation | 25 |
| 2.6.1.8 « Stripping » de la membrane | 25 |
| 2.7 Extraction des protéines nucléaires | 25 |
| 2.7.1 Matériel | 25 |
| 2.7.2 Méthode | 2 |
| 2.8 Dosage de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription p53, ATF-2 et AP-1 | 26 |
| 2.8.1 Principe | 26 |
| 2.8.2 Matériel | 26 |
| 2.8.3 Méthode | 26 |
| 2.8.3.1 Fixation des sondes | 26 |
| 2.8.3.2 Fixation des protéines nucléaires | 26 |
| 2.8.3.3 Fixation de l'anticorps primaire | 26 |
| 2.8.3.4 Fixation de l'anticorps secondaire | 27 |
| 2.8.3.4 Révélation | 27 |
| 3. Résultats | 28 |
| 3.1 Sénescence répllicative et induction par les UVB de la sénescence prématurée des fibroblastes de derme AGO4431 | 28 |
| 3.1.1 Détection de l'activité SA β -galactosidase | 28 |
| 3.1.2 Etude du potentiel prolifératif | 29 |
| 3.1.2.1 Incorporation de la thymidine tritiée | 29 |
| 3.1.2.2 Mise en évidence de la surexpression des protéines p53 et p21 ^{WAF1} | 29 |
| 3.2 Etude de l'activité de liaison à l'ADN de facteur de transcription et de l'activation de protéines liées à la réponse aux stress dans la SIPS induite par les UVB | 30 |
| 3.2.1 Etude de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription p53, AP-1 et ATF-2 | 30 |
| 3.2.2 Etude de l'activation des protéines de réponse aux stress, p38 ^{MAPK} et JNK, dans la SIPS induite sous UVB | 31 |
| 3.3 Mise au point d'un modèle d'inhibition des facteurs de transcription p53 et ATF-2 lors de la SIPS sous UVB | 31 |

| | |
|---|--------|
| 3.3.1 Inhibition de p53 par la pifithrin- α | 32 |
| 3.3.1.1 Mise au point d'un modèle d'inhibition | 32 |
| 3.3.1.2 Vérification du modèle d'inhibition de p53 | 33 |
| 3.3.2 Inhibition indirecte des facteurs de transcription ATF-2 et AP-1 par l'inhibiteur des JNK SP600125 | 33 |
| 3.3.2.1 Mise au point d'un modèle d'inhibition | 33 |
| 4. Discussion, conclusion et perspectives | 34 |
| 5. Bibliographie | 38 |